

GABRIEL GAMA NETTO

**EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM
DIFERENTES TEMPERATURAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A
HIDRÓLISE DE CASEÍNA NO LEITE DESNATADO PASTEURIZADO
MICROFILTRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N475e
2012

Netto, Gabriel Gama, 1986-

Efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas de refrigeração sobre a hidrólise de caseína no leite desnatado pasteurizado microfiltrado / Gabriel Gama Netto. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 63-71

1. Leite - Microbiologia. 2. Caseína. 3. Inovações tecnológicas. 4. Filtração por membranas.
5. *Pseudomonas fluorescens*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.14

GABRIEL GAMA NETTO

**EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM
DIFERENTES TEMPERATURAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A
HIDRÓLISE DE CASEÍNA NO LEITE DESNATADO PASTEURIZADO
MICROFILTRADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2012.

Prof.º Ítalo Tuler Perrone
(Coorientador)

Prof.º Nélio José de Andrade

Prof.º Luís Augusto Nero

Prof.º Marco Antônio Moreira Furtado

Prof.º Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

Dedico

A Deus pela minha saúde, inteligência e força.

Aos meus pais Tarcísio e Helena e às minhas
queridas irmãs Heloíza, Angélica e Érica.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento parcial deste trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimento da UFV, pela estrutura e apoio.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela amizade, orientação, apoio, confiança e sabedoria dedicados a mim nos últimos quatro anos, o que possibilitou realização deste trabalho.

Aos professores Ítalo Tuler Perrone, Maria Cristina Dantas Vanetti, Jane Sélia dos Reis Coimbra pelos ensinamentos e orientação.

Aos membros da banca, os professores Ítalo Tuler Perrone, Nélio José de Andrade, Luiz Augusto Nero e Marco Antônio Moreira Furtado.

Ao professor José Benício Paes Chaves pelo apoio estatístico.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos,

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da UFV pela concessão das culturas psicrotróficas.

Aos Professores Antônio Fernandes e Ítalo Perrone por estarem sempre presentes e atuantes em dias de microfiltração.

Aos professores da UFV que contribuíram pela minha formação e capacitação.

Aos amigos e estagiários Renam, Mara Betânia, Paulo Henrique pelo suporte na fábrica e no Laboratório de Leite.

A doutoranda Monique pelos treinamentos na técnica de eletroforese e sempre agradável convívio.

As companheiras de mestrado Maura, Mayara e Juliana que tiveram uma participação ativa no projeto.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Leite e Derivados com quem tive o prazer de trabalhar em duas gerações distintas de estudantes (Rosângela, Arlan, Gui, Michele, Naaman, Julia, Maura, Bia, Emilio, Jéssica, Geruza, Ramon, Érica e Marília) e os mais recentes (Renam, Maria Betânia, Paulo Henrique, Jaqueline, Lívia, Carla, Raquel e Juana).

Ao amigo Ari Roberto e sua família pelos bons anos de convivência e amizade.

Aos meus amigos Cássio, Gustavo, Nery, pelo convívio, força e carinho durante todo nosso caminho.

Aos meus amigos de república Atanásio e Edvaldo.

BIOGRAFIA

GABRIEL GAMA NETTO, filho de Tarcísio da Silva Neto e Maria Helena Gama Neto, é natural de Guanhães, Minas Gerais, onde estudou até o ensino fundamental.

No período de 2001 a 2003, concluiu o curso técnico em Agroindústria concomitantemente com o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, Minas Gerais.

Em 2006, iniciou sua graduação em Ciência e Tecnologia em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa onde trabalhou em diferentes projetos. Foi bolsista de iniciação científica e trabalhou com diferentes temas de pesquisa e extensão na área de ciência do leite, concluindo o curso em janeiro de 2010. No mesmo ano ingressou no programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos DTA/UFV nível mestrado concluindo-o em fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Granelização do leite no Brasil	2
2.2 Micro-organismos psicrotróficos no leite.....	4
2.3 Mecanismos de adaptação ao frio	5
2.4 Estabilidade térmica de enzimas	7
2.5 Micro-organismos psicrotróficos e produtos lácteos	8
2.6 Caseínas.....	9
2.7 Tecnologias de membranas.....	11
2.7.1 Histórico	11
2.7.2 Processos de separação por membranas (PSM).....	11
2.7.3 Objetivo de processos de separação por membrana (PSM).....	12
2.7.4 Microfiltração (MF)	13
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Cultivo e condições de cultivo	16
4.2 Delineamento experimental.....	17
4.3 Avaliação preliminar da atividade proteolítica	18
4.4 Análises microbiológicas	19
4.4.1 Contagens das bactérias psicrotróficas em LDR 12%.....	19
4.4.2 Contagem de mesófilos aeróbicos	19
4.4.3 Contagem de psicrotróficos	19

4.4.4	Contagem de esporos aeróbicos.....	20
4.5	Contagem de células somáticas	20
4.6	Microfiltração do leite	21
4.7	Avaliação da contaminação do ar da fábrica.....	21
4.8	Análises físico-químicas.....	22
4.8.1	Determinação de pH.....	22
4.8.2	Determinação de gordura	22
4.8.3	Análise de crioscopia.....	22
4.8.4	Análise de acidez	22
4.8.5	Nitrogênio Total (NT)	23
4.8.6	Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não proteico (NPN).....	23
4.8.7	Eletroforese SDS-PAGE.....	24
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
6.1	Monitoramento da multiplicação das bactérias psicrotróficas proteolíticas em temperaturas de refrigeração em LDR 12%.....	26
6.2	Monitoramento da atividade proteolítica em LDR 12%	29
6.3	Ensaio de proteólise em LDR 12%	29
6.4	Monitoramento microbiológico	35
6.4.1	Leite antes da microfiltração.....	35
6.4.2	Leite desnatado pasteurizado microfiltrado	38
6.5	Ensaio de proteólise.....	42
6.6	Análises físico-químicas antes da microfiltração.....	51
6.7	Análises físico-químicas do leite desnatado pasteurizado microfiltrado.....	53
6.7.1	Nitrogênio não proteico (NPN) e nitrogênio não caseínico (NCN).....	53
6.7.2	Acidez.....	57
6.7.3	pH.....	58
6.7.4	Crioscopia.....	59
7.	CONCLUSÃO	61
8.	SUGESTÕES.....	62

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 63

RESUMO

NETTO, Gabriel Gama, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas de refrigeração sobre a hidrólise de caseína no leite desnatado pasteurizado microfiltrado.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti, Ítalo Tuler Perrone e Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da multiplicação de uma estirpe psicotrófica proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C, estabelecidas pela Instrução Normativa 62 do MAPA, nas características físico-químicas e proteólise do leite microfiltrado. Amostras leite desnatado e pasteurizado foram inoculadas com a cepa *Pseudomonas fluorescens* 041 em uma concentração de aproximadamente 10^4 UFC mL⁻¹ e incubadas nas três temperaturas por 48 h e, posteriormente, submetidas ao processo de microfiltração. O leite microfiltrado teve a atividade proteolítica monitorada até o trigésimo dia por meio das análises de eletroforese e da composição das frações nitrogenadas nitrogênio não proteico (NPN) e nitrogênio não caseínico (NCN). Enquanto, o monitoramento microbiológico e das características físico-químicas foi realizado até o tempo 45 d. Após o tempo de incubação as contagens de micro-organismos psicotróficos atingiu $1,7 \times 10^6$, $3,2 \times 10^6$ e $4,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C, respectivamente. Após a microfiltração utilizando membrana de 0,8 µm de tamanho médio de poros não foi detectada a presença de micro-organismos por mL de leite, alcançando reduções logarítmicas de 6,9, 7,1 e 7,2 de micro-organismos mesófilos aeróbicos, 6,2, 6,1 e 6,7 para psicotróficos e 2,9, 3,0 e 2,1 de esporos aeróbicos nos leites pré-incubados a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. Durante os 45 d de estocagem o leite apresentou valores aproximadamente constantes de acidez, pH e crioscopia. O teor das frações de α-S1, α-S2, β, κ-caseínas mensurados no leite microfiltrado por meio dos géis de eletroforese permaneceram constantes ao longo de 30 d de monitoramento indicando ausência de proteólise. As frações (NPN) e (NCN) no leite microfiltrado também foram monitoradas até o trigésimo dia, não demonstrando aumento linear ao longo do tempo, embora o valor de NCN da temperatura de pré-incubação a 10 °C tenha apresentado valores médios superiores aos das temperaturas de pré-incubação de 4 e 7 °C. Os resultados mostram que na

temperatura de 10 °C ocorreu o início de proteólise durante a pré-incubação, sendo cessada após a microfiltração. A possível explicação da ausência de proteólise ao longo do tempo de estocagem do leite microfiltrado é porque nas concentrações atingidas da cepa psicotrófica após o tempo de pré-incubação não tenham sido suficientes para produção de enzimas extracelulares em níveis que pudessem proteolisar o leite microfiltrado. Com isso, a proteólise durante a pré-incubação a 10 °C foi atribuída a enzimas proteolíticas ligadas à célula bacteriana e teriam sido removidas durante a microfiltração junto com a bactéria por serem enzimas de membrana.

ABSTRACT

NETTO, Gabriel Gama, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February de 2012. **Effect of pre-incubation of *Pseudomonas fluorescens* at different cooled temperatures in proteolysis of the caseins of pasteurized skimmed microfiltered milk.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti, Ítalo Tuler Perrone and Jane Sélia dos Reis Coimbra.

This study evaluated the effect of the growth of a proteolytic psychrotrophic strain of *Pseudomonas fluorescens* at temperatures of 4, 7 and 10 °C on the physico-chemical characteristics and proteolysis of microfiltered milk. Skim milk was pasteurized and inoculated with the strain *Pseudomonas fluorescens* 041 at a concentration of approximately 10^4 mL CFU⁻¹ and incubated at three temperatures for 48 h and, subsequently subjected to the microfiltration process. The proteolytic activity of the microfiltered milk was monitored until the thirtieth day of analysis by means of electrophoresis and by the analysis of the composition of the non-protein nitrogen (NPN) and not casein nitrogen (NCN). Monitoring of the microbiological and physico-chemical characteristics was conducted until the time of 45 d. After the incubation time counts of psychrotrophic microorganisms reached $1,7 \times 10^6$, $3,2 \times 10^6$ and $4,8 \times 10^6$ CFU mL⁻¹ at the temperatures 4, 7 and 10 °C, respectively. After microfiltration using a membrane with pore size 0.8 µm in average, no presence of microorganisms per mL of milk could be detected, the logarithmic reductions were 6,9, 7,1 and 7,2 of aerobic mesophilic microorganisms, 6,2, 6,1 and 6,7 of psychrotrophic microorganisms and 2,9, 3,0 and 2,1 of aerobic spores in the milk pre-incubated at 4, 7 and 10 °C, respectively. During the 45 d of storage the milk showed approximately constant values of acidity, pH and freezing point. The content of the fractions of α-S1, α-S2, β and κ-casein in microfiltered milk measured by gel electrophoresis remained constant over 30 d of monitoring indicating the absence of proteolysis. Fractions (NPN) and (NCN) in microfiltered milk were also monitored until the thirtieth day, not showing a linear increase over time, although the value of NCN at a pre-incubation temperature of 10 °C has provided higher values than those of pre-incubation temperatures of 4 and 7 °C. The results show that the use of a temperature of 10 °C caused proteolysis during pre-incubation which is stopped after microfiltration. A possible explanation for the lack of proteolysis during the storage

time of the microfiltered milk is that concentrations of the psychrotrophic strain achieved after the time of pre-incubation were not sufficient for the production of extracellular enzymes at levels at which they could hydrolyze microfiltered milk. Thus, the proteolysis during pre-incubation at 10°C was attributed to proteolytic enzymes which are linked to the bacterial cell and these would have been removed during the microfiltration together with the bacteria.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um fluido complexo secretado pelas fêmeas de mamíferos que tem o propósito de satisfazer os requerimentos nutricionais dos recém-nascidos. Dessa forma, consiste na única fonte de energia (provida por lipídeos, proteínas e lactose), aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas, elementos inorgânicos e água para os neonatos.

Do ponto de vista físico-químico leite é uma secreção de pH próximo à neutralidade (6,5 a 6,7), constituído de emulsão de gorduras em água, estabilizadas por uma dispersão coloidal de proteínas, em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos. Possui também enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos como carotenos, xantofilas, riboflavina, células (epiteliais, leucócitos, bactérias e leveduras) e gases dissolvidos como CO₂, O₂ e N₂.

Devido a sua riqueza e diversidade de nutrientes, valor de pH próximo à neutralidade, o leite é um alimento completo e altamente suscetível a contaminação e desenvolvimento de micro-organismos. Com isso, se faz necessário durante todas as etapas da cadeia produtiva a introdução de mecanismos que minimizem sua contaminação e reduzam as taxas de desenvolvimento dessa microbiota contaminante. Em nível de produção primária, as Boas Práticas Agropecuárias devem adotadas e também iniciar a cadeia do frio que se estende as etapas subsequentes de transporte, industrialização e comercialização.

O procedimento de estocagem do leite cru na fonte de produção, sob refrigeração, possui, como vantagens, a redução simultânea dos custos operacionais de produção e a redução da perda da matéria-prima pela atividade acidificante das bactérias mesofílicas. Entretanto, deve-se considerar que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, na propriedade rural por até 48 h acrescido do tempo na indústria antes da pasteurização, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados à multiplicação e à atividade enzimática de bactérias psicrófilas. Esse grupo de bactérias apresenta a capacidade de se multiplicar na temperatura de refrigeração do leite.

A fração proteica representa aproximadamente 3,4 % (m/m) no leite de vaca, podendo ser dividida em três grupos principais: caseínas, proteínas do soro e nitrogênio não proteico. As caseínas representam 80 % em média dessa fração sendo um sistema proteico-alimentar constituído de diferentes frações de caseínas.

As proteases de micro-organismos psicrotróficos degradam as diferentes frações da micela de caseína, principalmente a K-caseína.

A proteólise microbiana contribui com a degradação do leite e tem consequência também sobre a vida de prateleira de seus derivados. A desestabilização da dispersão coloidal do leite de consumo está relacionada com a presença de micro-organismos psicrotróficos na matéria-prima e tem sido relatado como um problema de ordem mundial.

As enzimas proteolíticas da microbiota psicrotrófica, em sua maioria, são resistentes aos tratamentos térmicos aplicados no processamento de leite e derivados. A atividade residual dessas enzimas gera problemas de ordem tecnológica como perda de estabilidade térmica do leite, coagulação doce em leite UHT, perda de rendimento na fabricação de queijos além da má qualidade dos produtos lácteos. Tais problemas são ainda mais agravantes no Brasil, pois ainda hoje, em muitas propriedades a matéria-prima é de baixa qualidade. Por isso estudos com micro-organismos psicrotróficos e suas enzimas podem gerar contribuições para a cadeia produtiva do leite.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Granelização do leite no Brasil

A década de 90 no Brasil representou um momento histórico para a produção de leite, pois teve início a modernização dessa atividade econômica primária, com seus reflexos nos ganhos de produtividade, no início de um processo de competitividade com produtos importados e na ampliação substancial da qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores. A partir das primeiras regulamentações técnicas elaboradas para uniformização de produtos que circulavam no Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) tornou-se evidente o início e a necessidade da modernização da cadeia produtiva do leite. Nesse contexto, em 1992, foi fixado padrões de identidade e qualidade de produtos lácteos de maior interesse comercial (OLIVEIRA et al. 2000).

Em 1996, foi criado o “Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite” – PNQL por iniciativa do Ministério da Agricultura, da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e de diversos representantes da comunidade científica

(OLIVEIRA et al., 2000). A justificativa econômica para a execução do PNQL foi demonstrada em diagnósticos previamente realizados de perdas econômicas consideráveis na cadeia produtiva do leite pela condenação deste em decorrência da acidez elevada, ocorrência de mastite no rebanho ou outras zoonoses, perdas de produtividade do rebanho, perdas no transporte, na transformação da matéria-prima, na produtividade industrial e perdas de qualidade do produto acabado em razão da má qualidade da matéria-prima. A consequência do diagnóstico feito no PNQL foi o aperfeiçoamento da legislação federal, datada de 1952, provendo-a dos meios capazes de alavancar, juntamente com outras iniciativas dos setores público e privado, o desenvolvimento e a modernização do setor laticinista nacional.

A partir do diagnóstico para tentativa de melhoria da qualidade da cadeia leiteira criou-se a Resolução Normativa Nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em 2002, alterada pela Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2011). Essa resolução descreveu procedimentos de estocagem, coleta, transporte de leite cru e também criou diferentes categorias de leites em função de sua qualidade e manejo. O sistema de coleta passou a ser a granel, os tanques de refrigeração por expansão direta deveriam ser dimensionados de forma tal que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4 °C, no período máximo de 3 h após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Os tanques de refrigeração por imersão deveriam ser dimensionados de modo que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 7 °C, também no período máximo de 3 h, após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade (BRASIL, 2011).

A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) estabelece ainda que no tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento comercial, que irá beneficiá-lo, deve ser, de no máximo 48 h, independente de seu tipo; recomendando como ideal um período não superior a 24 h. Posteriormente, o leite é coletado e transportado em caminhões providos de tanques isotérmicos até a indústria (BRASIL, 2011). Entretanto, alguns aspectos do processo de granelização são preocupantes, como utilização de tanques de refrigeração coletivos, o tempo de refrigeração e a temperatura máxima de refrigeração do leite na propriedade rural.

O procedimento de estocagem do leite cru na fonte de produção, sob refrigeração, possui, como vantagens, a redução simultânea dos custos

operacionais de produção e a redução da perda da matéria-prima pela atividade acidificante das bactérias mesofílicas (PINTO, 2004). Entretanto, deve-se considerar que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, por períodos prolongados, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados à multiplicação e a atividade enzimática de bactérias psicotróficas.

2.2 Micro-organismos psicotróficos no leite

Os micro-organismos que normalmente contaminam o leite multiplicam numa ampla faixa de temperatura. Em função da faixa de temperatura e da temperatura ótima de multiplicação, os micro-organismos podem ser divididos em psicrófilos, mesófilos e termófilos. Micro-organismos psicrófilos são aqueles que têm temperatura de multiplicação entre 0 °C e 20 °C, com um ótimo menor que 15 °C (MORITA, 1975). Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos micro-organismos acidificantes no leite, e podem ser caracterizados por se multiplicarem entre temperaturas de 20 °C e 45 °C, com a temperatura ótima de multiplicação entre 30 °C e 40 °C (JAY et al., 2005). As bactérias termófilas são definidas como aquelas que apresentam temperatura ótima de multiplicação entre 45 °C e 65 °C, e para algumas espécies consideradas como termófilos extremos as temperaturas de multiplicação podem atingir 90 °C e o mínimo em torno de 35 °C (ICMSF, 1994).

O termo psicotróficos foi introduzido em 1960 e definido em 1976 pela FIL (Federação Internacional de Laticínios) como micro-organismos que têm a capacidade de formar colônias a 7 °C ou menos, durante um período de 7 a 10 d, sem considerar sua temperatura ótima de multiplicação (WEHR e FRANK, 2004).

Os micro-organismos psicotróficos estão amplamente distribuídos na natureza e sua principal fonte de contaminação no leite é a água sendo outras fontes o solo, poeira, vegetação e fezes (SHAH, 1994). Além disso, a contaminação antes e pós-processamento do leite e produtos lácteos está comumente associada à limpeza deficiente de superfícies em contato com alimentos e de equipamentos (SCHRODER et al., 2009; CHEN et al. 2011).

A contagem de micro-organismos psicotróficos no leite cru está relacionada com as condições higiênicas de produção em combinação com tempo/temperatura que o leite permanece estocado até o momento do processamento (COUSIN, 1982). Em condições higiênico-sanitárias adequadas de obtenção do leite, a microbiota

psicrotrófica representa menos que 10% da microbiota total inicial, comparada a mais de 75% sob condições não sanitárias (NIELSEN, 2002). A estocagem prolongada e temperaturas de refrigeração oscilatórias potencializam a multiplicação de psicrotróficos no leite cru (MURPHY e BOOR, 2000).

A maioria da microbiota psicrotrófica de relevância na indústria de laticínios inclui espécies de bactérias gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (COUSIN, 1982; WALKER, 1988; RYSER, 1999; PINTO, 2004).

PINTO (2004) identificou 136 espécies de bactérias de 153 isoladas de leite cru refrigerado originário de tanques de resfriamento individuais, coletivos e silos de estocagem de indústrias produtoras de leite UHT. Nesse estudo, observou-se atividade proteolítica nas temperaturas de 6,5, 21 e 35 °C nos três grupos de psicrotróficos, separados em gram-positivos, gram-negativos fermentadoras de glicose e gram-negativos não fermentadores de glicose, sendo o gênero *Pseudomonas* pertencente ao último grupo. As bactérias pertencentes a esse gênero são consideradas os agentes mais importantes na deterioração do leite a baixas temperaturas. Dentre as bactérias psicrotróficas contaminantes, *Pseudomonas* constitui o gênero encontrado com maior frequência no leite e em derivados mantidos sob refrigeração (ADAMS et al, 1976; COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 1998; URAZ e ÇITAK, 1998; WIEDMANN et al., 2000; PINTO, 2004; MARTINS et al., 2006a; ARCURI et al. 2008; CHEN et al. 2011).

2.3 Mecanismos de adaptação ao frio

Segundo Russell (1990) a capacidade dos micro-organismos de se multiplicarem a baixas temperaturas depende de mudanças adaptativas em suas proteínas e lipídeos celulares. As adaptações podem ser genotípicas e ou fenotípicas. As adaptações genotípicas ocorrem em uma larga escala de tempo regidas pela seleção natural também conhecida como seleção Darwiniana. As adaptações fenotípicas dentro de uma escala de tempo que abrange o tempo de vida do micro-organismo e pode ser em minutos, horas ou dias em resposta a

estímulos. As adaptações genótípicas são resultado de modificações evolutivas no genoma desses organismos, traduzidos principalmente em sistemas enzimáticos capazes de apresentar atividade catalítica a baixas temperaturas.

Jones et al. (1987) realizaram uma pesquisa com uma estirpe de *E. coli* variando bruscamente a temperatura de 37 °C para 10 °C, e observaram que a multiplicação foi interrompida por várias horas até que retomasse uma taxa de multiplicação. Durante a multiplicação a baixa temperatura a síntese proteica era não somente mais lenta como também, algumas proteínas sintetizadas a 10 °C não eram sintetizadas a 37 °C. Várias dessas proteínas chamadas de proteínas do choque frio (Csps) já foram identificadas e demonstravam ter um papel importante no processo de transcrição e tradução (Russel et al. 1990).

As Csps parecem estar envolvidas com a iniciação da síntese proteica na adaptação dos ribossomos a baixas temperaturas em psicrófilos e psicrotróficos (Russel, 1990). Krajewska e Szer (1967) mostraram que um extrato contendo ribossomos obtido de uma estirpe psicrófila de *Pseudomonas* teve uma taxa de erro de codificação muito baixa quando comparada com extrato ribossômicos de sistemas obtidos de mesofílicos e termofílicos incubados em temperaturas próximas a 0 °C. Nesse experimento os extratos foram colocados em presença de *E. coli* e incubados a 0 °C, e *E. coli* também foi utilizada como controle, não sendo isoladamente capaz de se multiplicar, enquanto somente o conjunto extrato da *Pseudomonas* + *E.coli* foram ativos (KRAJEWSKA e SZER, 1967).

Outro fator relacionado à adaptação dos micro-organismos ao frio é a manutenção da funcionalidade da membrana celular a baixas temperaturas. Dependendo da estirpe, a fluidez da membrana a baixas temperaturas pode ser alcançada por diferentes mecanismos adaptativos, tais como aumento na razão de ácidos graxos insaturados e/ou de cis duplas ligações, encurtamento da cadeia do ácido graxo e, em alguns casos raros, inserção de grupos metil como ramificação (HEBERT R., 1986; RUSSELL et al., 1990; RUSSEL e FUKUNAGA, 1990).

Em contraste a quantidade de relatos sobre proteínas relacionadas à adaptação ao frio, muitos dados estão descritos na literatura sobre lipídeos de membrana (CHAN et. al., 1971; BHAKOO e HERBERT, 1979; RUSSELL, 1989; 1990; RUSSEL e FUKUNAGA, 1990) porque esses componentes são fáceis de serem mensurados e a composição lipídica é um dos fatores que mais afetam as

propriedades das membranas tal como fluidez, relacionada à temperatura de solidificação desses lipídeos (RUSSELL, 1990).

Quando se faz estudos comparativos da composição de ácidos graxos de psicrófilos, mesófilos e termófilos é importante que os micro-organismos sejam intimamente relacionados (pelo menos do mesmo gênero), para eliminar o quanto possível variações de ordem genética. Adotando esse critério, Chan et al. (1971) comparou a composição de ácidos graxos de duas espécies termofílicas de *Clostridium* com uma mesofílica e outra psicrófila. A proporção de ácidos graxos insaturados aumentou na seguinte ordem: termófilos (média, 10%), mesófilos (37%), psicrófilos (52%). Os psicrófilos tiveram ainda maior proporção de ácidos graxos de cadeia curta (CHAN et al., 1971).

Bhakoo e Herbert (1979) estudaram o efeito da temperatura na composição de ácidos graxos de quatro espécies psicrotróficas de *Vibrio* (BHAKOO e HERBERT, 1979) e também de cinco espécies psicrotróficas de *Pseudomonas* (BHAKOO e HERBERT, 1980). Em duas espécies de *Vibrio* houve aumento da proporção de ácidos graxos insaturados quando incubadas a baixa temperatura, enquanto uma demonstrou decréscimo no tamanho da cadeia de ácidos graxos e a outra não teve sua composição lipídica alterada. Já no estudo com as espécies de *Pseudomonas*, nenhuma delas teve sua composição de ácidos graxos alterada quando a temperatura de incubação foi reduzida de 20 °C para 0 °C (BHAKOO e HERBERT, 1980). Não foram constatadas mudanças na saturação dos lipídeos das estirpes das *Pseudomonas* quando a temperatura foi reduzida, porque essa espécie contém entre 59 e 72% de lipídeos insaturados, lhes conferindo maior versatilidade que muitos outros micro-organismos (JAY et al., 2005).

2.4 Estabilidade térmica de enzimas

O problema relacionado à multiplicação de micro-organismos psicrotróficos no leite e em produtos lácteos é o poder deteriorador devido à produção de enzimas proteolíticas, lipolíticas e fosfolipases estáveis a alta temperatura (DRIESSEN, 1979; SØRHAUH e STEPANIAK, 1997). *Pseudomonas* sp., principais representantes das deteriorantes em alimentos refrigerados são inativadas pelos tratamentos térmicos utilizados rotineiramente na indústria, mas suas enzimas termoestáveis apresentam atividade mesmo após tratamento UHT (SØRHAUH e STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003).

Dois diferentes de tipos de enzimas termoestáveis podem ser distinguidas (MCKELLAR, 1989; STEPANIAK e SØRHAUH, 1995; VIEILLE e ZEIKUS, 1996; SØRHAUH e STEPANIAK, 1997):

- (1) Proteínases, lipases e fosfolipases (de origem de psicrotróficas, principalmente *Pseudomonas*), são estáveis a altas temperaturas e resistem a tratamentos de pasteurização e esterilização UHT, mas não são ativas acima de 50 a 60 °C. Essas enzimas apresentam uma temperatura ótima entre 30 °C a 45 °C, tendo baixa energia de ativação o que lhes confere maior atividade próximo de 4 °C a 7 °C do que enzimas de micro-organismos mesófilos (SØRHAUH e STEPANIAK, 1997).
- (2) Enzimas de bactérias termofílicas, são estáveis numa faixa 60 a 80 °C ou mais, demonstrando alta atividade catalítica nessa faixa de temperatura.

Muitas proteases oriundas de *Pseudomonas* são metaloenzimas contendo um átomo de zinco e até oito átomos de cálcio por molécula (MCKELLAR, 1989; SØRHAUH e STEPANIAK, 1991). Essas proteases são ativas sobre as diferentes frações de caseína e apresentam baixa atividade sobre as proteínas do soro (MCKELLAR, 1989; SØRHAUH e STEPANIAK, 1991).

O Cálcio estimula a secreção de proteases e lipases de algumas *Pseudomonas* e a presença desse íon é necessária para a estabilidade térmica de muitas proteases (MCKELLAR, 1989; SØRHAUH e STEPANIAK, 1991; 1995).

A microbiota psicrotrófica do leite é um fator importante para assegurar a qualidade de alguns produtos lácteos. Entretanto, resultados da literatura mostram que a contaminação do leite por bactérias psicrotróficas proteolíticas é frequente e de difícil controle. Estudos recentes (TOPÇU et al., 2006; MARCHAND et al., 2008; 2009) demonstraram que as enzimas proteolíticas de bactérias psicrotróficas apresentaram alta atividade residual após o tratamento térmico. Problemas relacionados à gelatinização e aparecimento de sabor amargo em leite UHT devido essa atividade residual são frequentes (TOPÇU et al., 2006).

2.5 Micro-organismos psicrotróficos e produtos lácteos

A deterioração do leite cru refrigerado ocorre principalmente em virtude da atividade de proteases e lipases. Enzimas proteolíticas produzidas por psicrotróficos agem sobre a κ -caseína o que resulta na desestabilização da micela de caseína e gelatinização do leite (RECIO et al., 2000). A lipólise ocorre devido a enzimas

naturais do leite e de origem microbiana. Essas enzimas são capazes de hidrolisar triglicerídeos, a principal gordura constituinte do leite, liberando ácidos graxos de cadeia curta como butírico, caprótico, caprílico e cáprico, principais responsáveis por *off-flavors* no leite e rancificação em queijos (CHEN et al., 2003). Mesmo em concentrações baixas, as proteases degradam as proteínas e as lipases degradam os lipídeos, causando defeitos em produtos de vida de prateleira longa, incluindo leite UHT e leite em pó, onde as enzimas são preservadas, podendo ser reativadas após reconstituição (CELESTINO et al., 1997). A proteólise do leite bovino pode também ser atribuída à atividade de proteases naturais do leite. A ocorrência de proteólise pela atividade de proteases termoestáveis é relacionada principalmente com a atividade da plasmina, uma serina protease e seu precursor inativo, plasminogênio (HUMBERT et. al., 1983; BASTIAN e BROWN, 1996).

Na indústria de queijos, um dos problemas enfrentados pelos produtores é a perda de rendimento em decorrência da atividade de proteases bacterianas sobre a caseína (CARDOSO, 2006). COUSIN (1982) constatou aumento considerável de nitrogênio total no soro de leite inoculado com psicrotróficos, sugerindo que a atividade metabólica dessas bactérias pode afetar o rendimento de queijos. CARDOSO (2006) confirmou a perda de rendimento durante a fabricação de queijo Minas Frescal com leite cru refrigerado inoculado de psicrotróficos mantido estocado em diferentes períodos de tempo.

Proteases termoestáveis produzidas por bactérias psicrotróficas contaminantes do leite cru são capazes de causar gelatinização em leite UHT. (DATTA e DEETH, 2001). Law et al. (1977) investigaram a geleificação de leite UHT por estirpes de *Pseudomonas fluorescens* isolada de leite cru e concluiu que o tempo levado para a formação de gel é dependente da extensão da multiplicação da bactéria antes do tratamento térmico.

2.6 Caseínas

A atuação de proteases produzidas por micro-organismos psicrotróficos sobre as caseínas tem como consequências a proteólise e modifica as características físico-químicas e vida de prateleira do leite. As caseínas, um grupo de proteínas específicas do leite, representam aproximadamente 80% do total de proteínas do leite de vaca e de outras espécies utilizadas comercialmente. Devido a sua

importância comercial, as caseínas têm sido estudadas extensivamente (FOX e MCSWEENEY, 2003).

Mellander (1939) realizou estudos com a caseína isoelétrica e utilizando centrifugação analítica e eletroforese, obteve três diferentes frações, sendo o primeiro a nomear os termos α , β e γ (em ordem crescente de mobilidade eletroforética). WAUGH e VON HIPPEL (1956) utilizaram CaCl_2 para separar a caseína em fração insolúvel e solúvel. A primeira fração representou, aproximadamente, 85 % do total da caseína, contendo α_s e β -caseína, enquanto a fração solúvel continha uma desconhecida proteína, que os autores chamaram de κ -caseína. A partir deste ponto de vista, a κ -caseína torna-se um importante componente na estabilidade e propriedades da micela de caseína. A α_s -caseína é a mistura de duas proteínas, α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína (ANNAN e MANSON, 1969).

Segundo Fox e Mcsweeney (2003), as quatro principais caseínas do leite são α_{s1} , α_{s2} , β e κ , e representam respectivamente 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas. Essas caseínas estão presentes no leite como uma associação de moléculas altamente hidratadas, denominadas micelas de caseínas, que constituem de 94 % de proteínas (caseínas) e 6 % de constituintes de baixa massa molar. Esses últimos são normalmente referidos como fosfato de cálcio coloidal. Constituem principalmente de cálcio, fosfato, pequena quantidade de magnésio e citrato, além de traços de outros elementos (GAUCHERON, 2004).

Por meio de microscopia eletrônica constata-se que as micelas de caseínas são geralmente esféricas com diâmetro variando de 50 a 500 nm (média de 150 nm) e massa variando de 10^6 a 3×10^9 Da (média 10^8 Da). São encontradas numa proporção de 10^{14} a 10^{16} micelas/mL de leite. Pequenas micelas estão presentes em grande quantidade, porém representam porção relevante da massa (FOX, 2003).

Além da grande importância na provisão de aminoácidos, cálcio e fósforo à nutrição do jovem mamífero (MACMAHON e OOMMEN 2007), a organização estrutural das micelas de caseínas é importante para determinação das propriedades físicas do leite. Conseqüentemente, a estabilidade da micela de caseína ou ainda sua desestabilização controlada, como no caso de queijos e leites fermentados, é uma questão crítica para indústria de laticínios.

2.7 Tecnologias de membranas

2.7.1 Histórico

A idéia do uso de membranas como ferramenta em processos de separação é provavelmente do século XVIII quando, em 1748, Abbé Nolet usou pela primeira vez a palavra osmose para descrever permeação de água utilizando um diafragma de bexiga de porco (BAKER, 2004). As primeiras membranas desenvolvidas com propósitos de separação e tendo como critério de classificação tamanho de poros foram de nitrocelulose e sua comercialização foi no início do século XX. Tentativas mal sucedidas de purificar água do mar utilizando essas membranas foram relatadas durante a segunda guerra mundial na Europa e nos Estados Unidos (POULIOT, 2008).

As crescentes preocupações sobre o abastecimento de água potável no sul da Califórnia estimulou o estabelecimento de programas de pesquisas em dessalinização de água na Universidade da Califórnia em Los-Angeles (UCLA), onde a primeira membrana de osmose reversa (RO) que apresentou fluxos razoáveis de permeação e água com qualidade potável foi desenvolvido no início da década de 60 (POULIOT, 2008).

A indústria de laticínios tem sido fortemente beneficiada pelos desenvolvimentos tecnológicos na área de pesquisas com separação por membranas que envolvem um grande número de operações unitárias como remoção de água, separação sólido-líquido ou líquido-líquido (POULIOT, 2008).

O número de aplicações bem sucedidas de membranas desenvolvidas para o processamento de leite e produtos lácteos desde 1970 são importantes e cada vez maiores. O desenvolvimento destas novas aplicações foi muitas vezes um resultado direto da evolução da ciência que estuda as membranas. Em vários casos, algumas questões-chave tecnológicas precisavam ser resolvidas antes que as membranas pudessem ser aplicadas no processamento de produtos lácteos.

2.7.2 Processos de separação por membranas (PSM)

Os processos de separação por membranas que são utilizados na indústria de laticínios são quatro: microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose reversa (RO). Segundo Carvalho e Maubois (2010) esses quatro processos podem ser definidos como:

Microfiltração (MF): processo que utiliza gradiente de pressão como força motriz para separação utilizando membranas porosas com diâmetro de tamanho médio de poros acima de 0,1 μm permitindo a retenção de todas as partículas de leite (células somáticas, glóbulos de gordura, bactérias e micelas de caseína).

Ultrafiltração (UF): processo que utiliza gradiente de pressão como força motriz para separação utilizando membranas porosas com diâmetro de tamanho médio de poros na faixa de 0,001 a 0,1 μm , mas para esse processo o tamanho de corte é preferencialmente expresso pela massa molecular da macromolécula retida em kDa. UF permite a permeação de lactose, sais minerais solúveis e água.

Nanofiltração (NF): processo que utiliza gradiente de pressão como força motriz para separação utilizando membranas carregadas com diâmetro de tamanho médio de poros em 0,001 micrómetros (1 nanômetro). NF retém lactose e todos os outros componentes maiores do leite, mas permite a permeação de íons monovalentes solúveis e água.

Osmose Reversa (RO): processo que utiliza gradiente de pressão como força motriz para separação em membrana por difusão, utilizando membranas não porosas. RO é um processo de concentração que permite a permeação de água apenas.

O esquema dos solutos que ficam retidos pelas membranas nos diferentes processos estão representados na Figura 1.

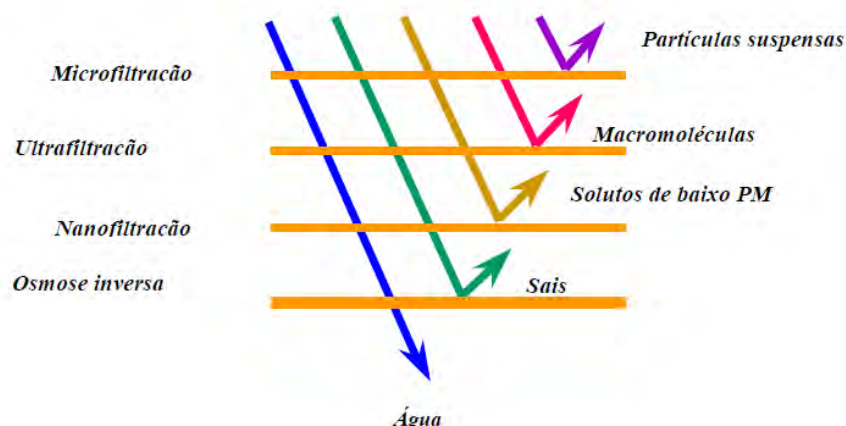


Figura 1 – Solutos retidos pelas diferentes membranas (adaptado GOMES, 2009)
2.7.3 Objetivo de processos de separação por membrana (PSM)

Os processos de separação por membranas (PSM) são operações que utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões

abrangendo espécies de tamanho e natureza química diferentes. Estes processos são usados para efetuar grande variedade de separações, sendo definidos como barreiras seletivas ao transporte de massa de certos componentes de uma amostra (BALDASSO, 2008). O objetivo principal de qualquer PSM é a separação, a concentração e/ou a purificação de algum componente presente em solução. Isto pode ser alcançado devido à capacidade seletiva da membrana de transportar um determinado componente da fase de alimentação mais prontamente que qualquer outro componente presente. Isso ocorre devido às diferenças existentes entre as propriedades físicas e/ou químicas da membrana e dos componentes que permeiam (MULDER, 1996; citado por BALDASSO, 2008).

Diferentemente do processo convencional de filtração, em que a filtração é perpendicular à superfície filtrante as tecnologias de membranas utilizam filtração tangencial. A filtração tangencial torna possível o funcionamento dos equipamentos por tempo suficiente e com fluxos de permeação que viabilizem o processo (CORREIA et al., 2011). A representação esquemática da filtração tangencial pode ser visualizada na Figura 2.

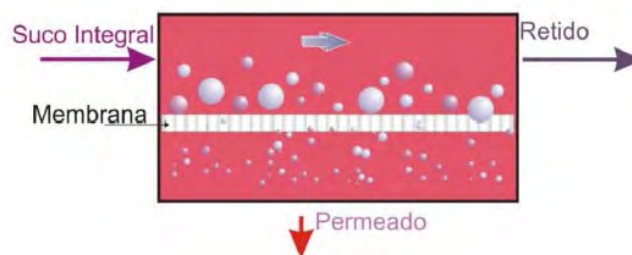


Figura 2 – Esquema filtração tangencial (Adaptado de GOMES, 2009)

2.7.4 Microfiltração (MF)

Microfiltração (MF) como todos os outros processos de separação por membrana é uma técnica que permite a concentração diferencial no líquido retido pela membrana, chamado retentado, dos componentes com um tamanho maior do que a o diâmetro médio dos poros da membrana. O líquido que atravessa a membrana é chamado de permeado ou microfiltrado. O permeado apresenta as mesmas concentrações que o líquido de entrada, dos componentes com um tamanho menor que o diâmetro médio dos poros da membrana (SABOYA e MAUBOIS 2000).

Tabela 1. Diâmetro médio das partículas do leite (adaptado de Pierre et al. 1998)

Componente	Tamanho (μm)
Micelas de caseína	0,300 – 0,032
Bactérias	15,000 – 0,200
Glóbulos gordura	6,000 – 0,200
Células somáticas	15,000 – 6,000

O diâmetro médio dos poros de membranas de microfiltração pode variar de 10 μm a 0,1 μm , o que significa que a microfiltração pode ser utilizada para separações específicas de partículas em suspensão (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

O leite contém partículas cuja distribuição de tamanho (Tabela 1) é relativamente bem definida por faixa de tamanho. Por ordem decrescente de tamanho as células somáticas (15 – 6 μm), glóbulos de gordura (15 – 0,2 μm), bactérias (6 – 0,2 μm) e micelas de caseínas (0,3 -0,03 μm) (PIERRE et al. 1998).

O avanço em MF na indústria de laticínios veio nos anos 80 com o desenvolvimento das novas membranas cerâmicas compreendendo uma geometria multi-canal e suporte altamente permeável (GILLOT e GARCERA, 1986), e a criação do industrialmente conceito hidráulico revolucionário proposto por Sandblom (SANDBLOM, 1974): a baixa pressão transmembrana uniforme (UTP). O conceito UTP supera a maioria dos problemas de *fouling* (incrustamento) na membrana de MF, resultando em maiores velocidades do fluxo tangencial necessário para a obtenção de alta taxa de permeação e seletividade.

A filtração tangencial utilizada na MF emergiu como uma tecnologia de separação industrial na indústria de laticínios com pelo menos três aplicações principais:(i) remoção de bactérias (TROUVÉ et al. , 1991; MALMBERG e HOLM, 1998), (ii) desnate de soro (PIERRE et al., 1994), e (iii) enriquecimento em caseína micelar para fabricação de queijos (FAUQUANT et al. 1988), mas atualmente outras aplicações têm sido utilizadas como: remoção de células somáticas do leite cru, microfiltração de salmouras, fracionamento de proteínas do leite e produção de queijos com olhaduras (CARVALHO e MAUBOIS, 2010).

O maior interesse em aplicação da MF na indústria de laticínios é a remoção de micro-organismos em leite desnatado com o objetivo de obtenção de um produto mais próximo ao *in natura*, sem bactérias, o qual é transformado em leites fluidos, queijos ou produtos com maior vida de prateleira tais como pós ou derivados de proteínas (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

O leite coletado pelos laticínios contém uma microbiota autóctone com diferentes espécies que ilustram as contaminações pelo úbere, água, equipamento de ordenha, atmosfera local, tanque de expansão e o transporte. Levando-se em consideração todas essas fontes de contaminação o leite coletado sempre apresentará algum nível de contaminação, uma vez que a criação de animais para produção de leite não ocorre em ambiente completamente asséptico (SABOYA E MAUBOIS, 2000). Sempre há o risco de contaminação do leite por bactérias patogênicas aos seres humanos tais como *Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium* ou *Salmonella*.

A remoção do risco potencial da microbiota contaminante do leite, tem sido por mais de 50 anos pela aplicação de tratamento térmicos tais como a pasteurização HTST (alta temperatura por curto tempo) ou esterilização UHT. O tratamento térmico efetivamente inativa a maioria da microbiota contaminante, mas as células mortas permanecem no leite com seu potencial enzimático ativo e também a atividade metabólica de bactérias termodúricas causa alterações no leite fluido durante a estocagem, reduzindo a vida de prateleira (CARVALHO e MAUBOIS, 2010).

A microfiltração oferece uma alternativa interessante ao tratamento térmico. O estudo realizado utilizando filtração por membranas por Madec et al. (1992) mostrou que para bactérias patogênicas potencialmente encontradas em leite como *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Salmonella* Typhimurium e *Micobacterium tuberculosis* foi conseguido reduções decimais de 3,4, 4,0, 3,5 e 3,7, respectivamente. Esses resultados irão assegurar que o leite desnatado microfiltrado a 1,4 µm conterá menos de 1 UFC mL⁻¹ dessas bactérias nos níveis de contaminação frequentemente encontrados nas fazendas descritos na literatura (CARVALHO e MAUBOIS, 2010).

A forma esporulada de bactérias, principal forma de resistência ao tratamento térmico de pasteurização também é retida pela membrana de microfiltração por causa de seu grande volume celular (TROUVÉ et al., 1991) e reduções decimais maiores que 4,5 foram observadas. Uma redução logarítmica de 6,5, 5,4 e 4,1 de mesófilos aeróbicos, coliformes totais e *Clostridium* sp. foi obtido na fabricação de queijos com olhadura a partir de leite microfiltrado (DIAS, 2011).

A utilização de microfiltração com membranas de menor diâmetro de poros (0,8 µm) foi proposta por Lindquist (1998) e estudado na Suécia, França (AFSSA,

2002) e Canadá. Com essa nova membrana foi observada uma redução decimal maior que 12 de esporos *Clostridium botulinum* o que garante a esterilidade comercial do produto (CARVALHO e MAUBOIS, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da pré-incubação com *P. fluorescens* no leite nas temperaturas de refrigeração 4, 7 e 10 °C, estabelecidas pela legislação, sobre a vida de prateleira do leite microfiltrado.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Monitorar o efeito da multiplicação de quatro isolados de bactérias psicrotróficas proteolíticas em LDR 12%;
- ✓ Avaliar o efeito da pré-incubação da *P. fluorescens* 041 nas características físico-químicas do leite microfiltrado;
- ✓ Monitorar a atividade proteolítica no leite ao longo do tempo de estocagem;
- ✓ Verificar qual fração da micela de caseína é preferencialmente degradada pelas proteases produzidas por bactérias psicrotróficas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo e condições de cultivo

As bactérias utilizadas neste estudo foram as bactérias psicrotróficas proteolíticas 04A, 06D e 11A, isoladas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados a partir de leite cru, ainda não identificadas e *P. fluorescens* 07A e 041 isoladas por Pinto (2004), reconhecidamente proteolíticas, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da UFV.

As culturas foram mantidas congeladas a -80 °C em caldo Luria-Bertani (LB), adicionado de 20% glicerol como agente crioprotetor, sendo ativadas quando necessário, duas vezes em caldo LB a 21 °C por 24 e 12 h, respectivamente. Este meio foi utilizado para o cultivo e manutenção das células durante o experimento.

4.2 Delineamento experimental

As análises microbiológicas e físico-químicas foram conduzidas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, enquanto a etapa de preparo e microfiltração do leite nas dependências do Laticínios Escola.

Para estudo preliminar da atividade proteolítica das diferentes bactérias proteolíticas em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) 12% de sólidos totais (m/v) foram utilizadas as bactérias *P. fluorescens* 07A e as codificadas por 04A, 06D e 11A. O efeito do crescimento destas bactérias em LDR 12% foi avaliado nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C. O procedimento foi realizado em duplicata.

Na segunda etapa do trabalho, foi avaliado o efeito da multiplicação da estirpe *P. fluorecens* 041 durante 48 h em leite desnatado pasteurizado mantido nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C. Esse procedimento foi definido como período de pré-incubação. Os leites pré-incubados nas três temperaturas foram microfiltrados e mantidos refrigerados a 7 °C por até 45 d. Esse procedimento foi realizado em três repetições. Durante os 45 d o leite foi monitorado em suas características microbiológicas e físico-químicas. A estirpe de *P. fluorescens* 041 foi escolhida para segunda esta etapa do projeto por ser mais proteolítica que as utilizadas nos testes preliminares O fluxograma desta etapa do projeto está representado na Figura 3.

Em cada repetição foram coletados 200 litros de leite cru em latões plásticos de 50 litros, previamente esterilizados. O leite utilizado no projeto foi coletado no estábulo do Departamento de Zootecnia da UFV imediatamente após a ordenha. O leite foi transportado para o Laticínios Escola e centrifugado e armazenado novamente em três latões de aço inox estéreis, de capacidade 50 litros. O leite foi imediatamente submetido ao tratamento de pasteurização 63 °C por 30 minutos, com trocador de calor indireto, submergindo os latões em tanques de aço inoxidável camisa dupla com entrada para vapor. Após a pasteurização o leite foi refrigerado até 10 °C por circulação de água gelada. Nos três latões de leite pasteurizado resfriados foram inoculados a *P. fluorescens* 041 na concentração de aproximadamente 10^4 unidades formadora de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹). Os latões contendo leite pasteurizado contendo a estirpe 041 de *P. fluorescens* foram então incubados refrigerados em estufas tipo BOD (EL 101/3-E ELETRO lab[®], Brasil) a 4, 7 e 10 °C por um período de 48 h, quando o leite foi microfiltrado.

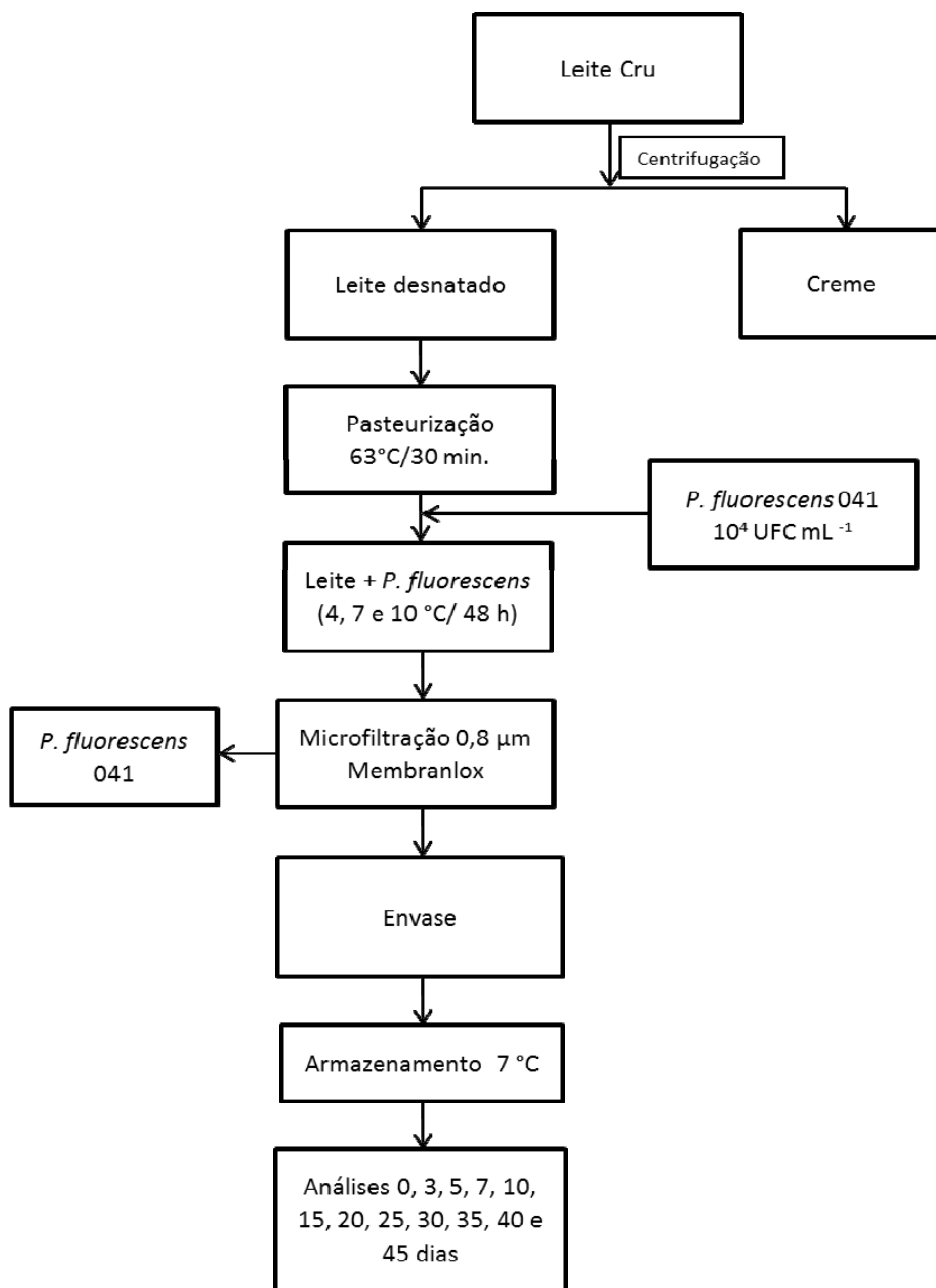


Figura 3 – Fluxograma de produção de leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubado com *P. fluorescens* 041

Após a microfiltração as amostras de leite foram envasadas manualmente em garrafinhas de polietileno de baixa densidade e estocadas refrigeradas a 7 °C por 45 d. Durante a etapa de microfiltração a qualidade do ar foi avaliada para estimar a possibilidade de contaminação durante o envase.

4.3 Avaliação preliminar da atividade proteolítica

As bactérias foram ativadas em caldo LB, a 21 °C por 24 h, em seguida foram inoculadas mediante método de micro-gotas (2 µL) descrito em Silva et al. (2007), em placas de Petri contendo ágar leite (meio para contagem padrão em placas adicionado de 10% de LDR 10%) e incubadas por 24 h a 21 °C e também por 7 d a 7 °C. A atividade proteolítica foi evidenciada pela formação de halo translúcido ao redor da colônia (WASSIF et al., 1995).

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Contagens das bactérias psicotróficas em LDR 12%

A multiplicação dos isolados 04A, 06D, *P. fluorescens* 07A e 011A em LDR 12%, nas diferentes temperaturas, foi monitorada durante 17 d. Para isto foram realizadas diluições decimais e plaqueamento, em meio LB, dos tratamentos mostrados na, nos tempos 0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, e 17 d pós-inoculação das culturas em LDR, pela técnica de micro-gotas (SILVA et al., 2007).

A curva de crescimento dos micro-organismos foi feita com base nos dados da contagem obtidos durante os 17 d de análise, utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

4.4.2 Contagem de mesófilos aeróbicos

Foi transferido 1 mL da amostra de leite para 9 mL de solução salina – peptonada e homogeneizadas em vortex. Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa, nos leites inoculados com *P. fluorescens* 041 e no leite microfiltrado as diluições 10^0 e 10^{-1} foram utilizadas. Volumes de 1,0 mL de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm para mesofilos aeróbicos (Petrifilm™ AC, 3M Microbiologia) de acordo com Wehr e Frank (2004). As placas foram incubadas a 32 °C ± 1 °C por 48 h. Os resultados foram obtidos pela multiplicação das contagens encontradas pelo inverso da diluição utilizada e expressos em UFC mL⁻¹.

4.4.3 Contagem de psicotróficos

Foi transferido 1 mL da amostra de leite para 9 mL de solução salina – peptonada e homogeneizadas em vortex. Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 25 e 250 colônias por placa, nos leites inoculados com *P. fluorescens* 041 e no leite microfiltrado as diluições 10^0 e 10^{-1} foram

utilizadas. Foi semeado 1 mL de cada diluição selecionada para placas de Petri descartáveis. Adicionou-se, aproximadamente, 12 a 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA Himedia[®], Índia) fundido e resfriado a 45 ± 1 °C. As placas foram incubadas invertidas a 7 ± 1 °C por 10 d (WEHR E FRANK, 2004). Para o cálculo o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL da amostra multiplicou-se o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

4.4.4 Contagem de esporos aeróbicos

A metodologia para contagem de esporos mesófilos aeróbicos utilizada está descrita em Wehr e Frank (2004). Foi transferido, aproximadamente, 200 mL de amostra de leite para garrafas *shot*. As garrafas contendo as amostras de leite e uma contendo leite controle para medição da temperatura foram colocadas em banho maria (MA 156/6, MARCONI, Brasil) com temperatura ajustada para 81 °C. A temperatura foi monitorada utilizando termômetro digital (INCOTERM[®]). As amostras foram mantidas a 80 °C por 12 minutos e imediatamente resfriadas em banho de água com gelo. As diluições seriadas foram realizadas transferindo-se 1 mL da amostra para tubos contendo 9 mL de solução salina-peptonada. Foram escolhidas diluições em que se esperava obter enumeração entre 25 e 250 colônias por placa, nos leites inoculados com *P. fluorescens* 041 e no leite microfiltrado as diluições 10^0 e 10^{-1} foram utilizadas. Foi transferido 1 mL de cada diluição selecionada para placas de Petri descartáveis e adicionou-se, aproximadamente, 12 a 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e resfriado a 45 ± 1 °C. As placas foram incubadas invertidas a 32 ± 1 °C por 48 h.

4.5 Contagem de células somáticas

O número de células somáticas foi estimado utilizando kit Somatic Test. O detergente reagente foi diluído 1:1 em água destilada. O volume de 2 mL do detergente diluído foi colocado em um tubo cilíndrico graduado apoiado por um suporte com capacidade para 10 tubos. Cada tubo contém uma tampa com pequeno orifício. À solução reagente é adicionado 2 mL de leite cru a temperatura ambiente e agitados em movimentos de 90 graus por 20 segundos com orifício do tubo para cima. Após a mistura o suporte foi virado com o orifício para baixo por 10 segundos. O número de células somáticas é estimado a partir do volume da mistura

que não foi perdido pelo orifício. O volume restante foi lido na graduação do tubo e correlacionado com o número de células somáticas na tabela que acompanha o kit.

4.6 Microfiltração do leite

A microfiltração foi realizada em equipamento construído pela empresa Tetra Pak Processing França. Na primeira etapa do processo foi realizada a higienização do equipamento com dois ciclos de limpeza CIP, alcalino e ácido respectivamente. O equipamento antes da microfiltração do leite foi submetido a testes correlacionando vazão e pressão que atestam a adequabilidade ou não do sistema. Cada latão de leite desnatado pasteurizado inoculado com *P. fluorescens* 041 incubado a diferentes temperaturas foi aquecido em tanque de camisa dupla a 50 °C e filtrado tangencialmente através de uma membrana cerâmica tubular “Membralox®” com poros de tamanho de 0,8 µm; velocidade de permeação de 7,2 m/s; sistema com área total de membrana de 0,24 m²; e variação da pressão transmembrana até cerca de 0,5 bar. Entre a microfiltração do leite de cada temperatura de pré-incubação foi realizado o processo de limpeza e sanitização do equipamento. O leite microfiltrado foi embalado em recipientes plásticas de 200 mL de material polietileno de baixa densidade. Os recipientes plásticos foram previamente mantidos em solução clorada 200 mg L⁻¹ no valor de pH 6,5.

4.7 Avaliação da contaminação do ar da fábrica

A qualidade do ar na fábrica durante a etapa de microfiltração foi avaliada pelo método de sedimentação em placas descrito por Wehr e Frank (2004). Placas de Petri estéreis/descartáveis foram preparadas vertendo-se 12-15 mL de agar padrão para contagem (PCA) previamente fundido e resfriado a 45 ± 1 °C. As placas foram mantidas abertas por 15 minutos durante a etapa de microfiltração e envase de cada tratamento. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por semana segundo a fórmula:

$$\text{Partículas viáveis cm}^{-2} \text{ semana}^{-1} = \frac{\text{UFC} \times 10000}{(\pi \times r^2) \times t} \quad (\text{Eq. 1})$$

UFC: nº de colônias na placa após incubação;

r: raio da placa da placa de Petri em cm;

t: tempo de sedimentação em minutos;

*: minutos em uma semana.

4.8 Análises físico-químicas

4.8.1 Determinação de pH

A determinação do potencial hidrogeniônico foi realizada utilizando medidor de pH (Dimed DM 20, São Paulo), por meio da introdução do eletrodo na amostra.

4.8.2 Determinação de gordura

O teor de gordura foi determinado utilizando-se o método de Gerber descrito por Wehr e Frank (2004). Foram transferidos 10 mL de ácido sulfúrico densidade 1.825 g/L para o butirômetro de referência para leite desnatado, em seguida com auxílio de uma pipeta volumétrica 11 mL da amostra foi adicionada cuidadosamente e por último 1 mL de álcool iso-amílico densidade 811 g/L. O butirômetro foi então agitado vigorosamente e posteriormente centrifugado por cinco minutos. A leitura do resultado foi realizada diretamente na escala do butirômetro e expresso em percentual (m/v). As amostras foram analisadas em duplicata.

4.8.3 Análise de crioscopia

O ponto de congelamento foi realizado transferindo-se 2,5 mL da amostra para cubetas cilíndricas de vidro e levadas a crioscópio modelo MK 540 (ITR Instrumentos para Laboratórios Ltda, Brasil). As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos em graus Horvert (°H).

4.8.4 Análise de acidez

Foi transferido com pipeta volumétrica 10 mL de leite para erlenmeyer de 125 mL e adicionado três gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. A titulação foi realizada utilizando solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, sendo o ponto final da titulação a viragem do indicador para coloração levemente rosa. Cada amostra foi analisada em duplicata e os resultados foram expressos em porcentual de ácido láctico (m/v) segundo a fórmula:

$$A = \frac{Cl \times fc \times v \times 9}{mL} \quad (\text{Eq. 2})$$

A: acidez expressa em percentual de ácido láctico (m/v);

Ci: concentração da solução de hidróxido de sódio (mol/L);
fc: fator de correção da solução de hidróxido de sódio;
v: volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra;
mL: volume da amostra.

4.8.5 Nitrogênio Total (NT)

A determinação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, que se desenvolve em três etapas. Inicialmente promoveu-se a oxidação (digestão) (Digestor Buchi, Suíça) da amostra a 400 °C pelo ácido sulfúrico em presença de catalisadores rompendo a estrutura proteica para a liberação do nitrogênio sob a forma de sais de amônio. À amostra digerida e resfriada a temperatura ambiente foi adicionada da solução de NaOH 40% para liberação do nitrogênio na forma de amônia durante destilação (destilador Buchi, Suíça), coletando o destilado em solução de ácido bórico 4% (adicionado de indicadores), com o qual reagem formando metaborato de amônio. Esse sal foi titulado por neutralização com HCl 0,05 mol L⁻¹, representando a fração nitrogenada que se deseja determinar. Os resultados foram expressos em percentual de nitrogênio total por meio da fórmula:

$$\% NT = \frac{(A-B) \times C_i \times 1.4}{mL} \quad (\text{Eq. 3})$$

% NT: teor percentual de nitrogênio total (m/v);

A: volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra;

B: volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

fc: fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

mL: volume de amostra (considerando-se a diluição efetuada de acordo com a metodologia)

A concentração de proteína foi calculada multiplicando-se o teor de NT por 6,38, de acordo com a FIL (International Dairy Federatiom) 20B:1993.

4.8.6 Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não proteico (NPN)

O teor de NCN foi mensurado a partir de filtrado do leite acidificado a pH 4,6 utilizando solução HCl $1,41 \text{ mol L}^{-1}$ adaptado da norma FIL (FIL 20B:1993). Para concentração de NPN foi realizada pela diluição da amostra em uma parte igual de água destilada e posteriormente adicionada de TCA 24 % (m/v) em um volume igual ao da amostra diluída, para que o teor final de TCA fosse 12 %. Os filtros usados foram Whatman Nº 42 para ambas as análises. O teor de nitrogênio foi determinado segundo método de Kjeldahl (FIL 20B:1993), sendo convertido para concentração equivalente de proteína pelos fatores 6,25 para NCN e 6,19 para NPN.

4.8.7 Eletroforese SDS-PAGE

O preparo das amostras para monitoramento da proteólise foi adaptado de ADAMS et al. (1976). Alíquotas de leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico 3 M, sob agitação constante. Posteriormente, foram centrifugadas a $3.380 \times g$, por 10 minutos. O soro foi eliminado e a caseína precipitada congelada a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ até o dia da análise. As amostras tiveram o volume original reconstituído em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 9 e para aplicação no gel as amostras oriundas do leite microfiltrado e leite pasteurizado foram diluídas 20 vezes, enquanto amostras de LDR 12% foram diluídas 4 vezes.

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo Judd (1994), em gel de três fases, composto por um gel de empilhamento (5,0% T), um gel intermediário (10,0% T) e um gel de separação (16,0% T). Para o gel intermediário e de separação, utilizou-se uma solução 49,5% T (m/v) a partir de uma solução composta por acrilamida:N,N'-bis-metileno acrilamida (48,0:1,5). Para o gel de empilhamento, foi utilizada a solução 30,0% T (m/v) a partir de uma solução acrilamida:N,N'-bis-metileno acrilamida (29,2:0,8). O gel de separação foi preparado a 16% T, em Tris-HCl 3 M, pH 8,9 contendo 0,3% de SDS. O gel intermediário foi preparado a 10% T, em Tris-HCl 3 M, pH 8,9 contendo 0,3% de SDS. O gel de empilhamento foi preparado a 5% T, em Tris-HCl 1 M, pH 6,8. Os géis foram polimerizados quimicamente, pela adição de N,N,N',N'-tetra-metileno-diamina (TEMED) e persulfato de amônio 10%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba eletroforética vertical Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad California, U.S.A) utilizando tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,6 (LAEMMLI, 1970), com voltagens de 100 V por 10 minutos, 80 V por 15 minutos e 60 V por 5 h utilizando fonte PowerPac™ Basic (Bio-Rad California, U.S.A). Os géis foram corados, à

temperatura ambiente, em solução de Coomassie® Brilliant Blue R-250 a 0,3% em metanol: ácido acético: água (4,5:1:4,5 v/v). Posteriormente, foram revelados e descorados em solução de ácido acético e metanol.

Para confecção dos densitogramas os géis foram escaneados em Scanner HP 2410 Photosmart. A intensidade da proteólise ao longo do tempo foi avaliada através da captação de imagem de cada banda representada por cada uma das frações de caseína. O programa utilizado para captação de imagem foi ImageJ ® (National Institute of Health, USA). O número de pixels foi captado em uma determinada área selecionada referente cada fração de caseína, representada por uma banda. No tempo zero cada fração de caseína foi considerada 100%.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado num fatorial composto para avaliar as características do leite desnatado pasteurizado microfiltrado durante até 45 d. Os fatores estudados foram temperatura e tempo, sendo três níveis de temperatura 4, 7 e 10 °C e 8 e 9 níveis de tempo para análise de eletroforese e das frações nitrogenadas, respectivamente. Inicialmente os dados foram analisados num modelo quadrático completo segundo a equação 4. Os coeficientes do modelo que não foram significativos ($P > 0,05$) foram tirados do modelo até que se ajustasse um modelo mais simples para variação dos dados.

$$Y_{ij} = m + Tr_i + Tp_j + Tr_i^2 + Tp_j^2 + (TrTp)_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{Eq. 4})$$

Y_{ijk} = valor observado na resposta (variável dependente), na unidade experimental referente ao nível i de Tr e j de Tp na repetição k ;

m = média geral;

Tr_i = temperatura de pré-incubação do leite contendo *P. fluorescens* 041 no nível i ;

Tr_i^2 = efeito quadrático da temperatura de pré-incubação do leite contendo *P. fluorescens* 041 no nível i ;

Tp_j = tempo em que a unidade experimental foi avaliada no nível j ;

Tp_j^2 = efeito quadrático do tempo no nível j ;

$(TrTp)_{ij}$ = interação entre temperatura de pré-incubação e tempo;

e_{ijk} = erro aleatório com pressuposição de distribuição normal independentemente distribuído, com variância constante.

Os dados foram analisados no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa, 2010.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Monitoramento da multiplicação das bactérias psicrotróficas proteolíticas em temperaturas de refrigeração em LDR 12%

Durante o monitoramento da multiplicação das bactérias psicrotróficas proteolíticas observou-se, para todas as bactérias estudadas, um período muito curto de adaptação, resultado que é compreensível já que as bactérias foram previamente ativadas em LDR 10 %. O isolado 04A multiplicou mais lentamente na temperatura de 4 °C até o quinto dia (Figura 4a) e atingiu o fim da fase logarítmica no nono dia. Nas temperaturas de 7 e 10 °C, o isolado da bactéria 04A atingiu uma concentração de células de 10^8 UFC mL⁻¹ no quinto dia de análise, correspondendo a um aumento de dois ciclos logarítmicos. No nono dia a concentração de células atingiu 10^9 UFC mL⁻¹ à temperatura de 10 °C e esta concentração manteve-se até o décimo quarto dia de monitoramento, aproximadamente.

A multiplicação da bactéria 06D (Figura 4b) mostrou-se muito semelhante ao da bactéria 04A. Foi possível observar uma maior multiplicação em todos os tempos na temperatura de 10 °C, já que esta temperatura é crítica no sistema de refrigeração do leite, permitindo uma maior multiplicação dos micro-organismos psicrotróficos uma vez que está mais próxima da sua temperatura ótima de multiplicação.

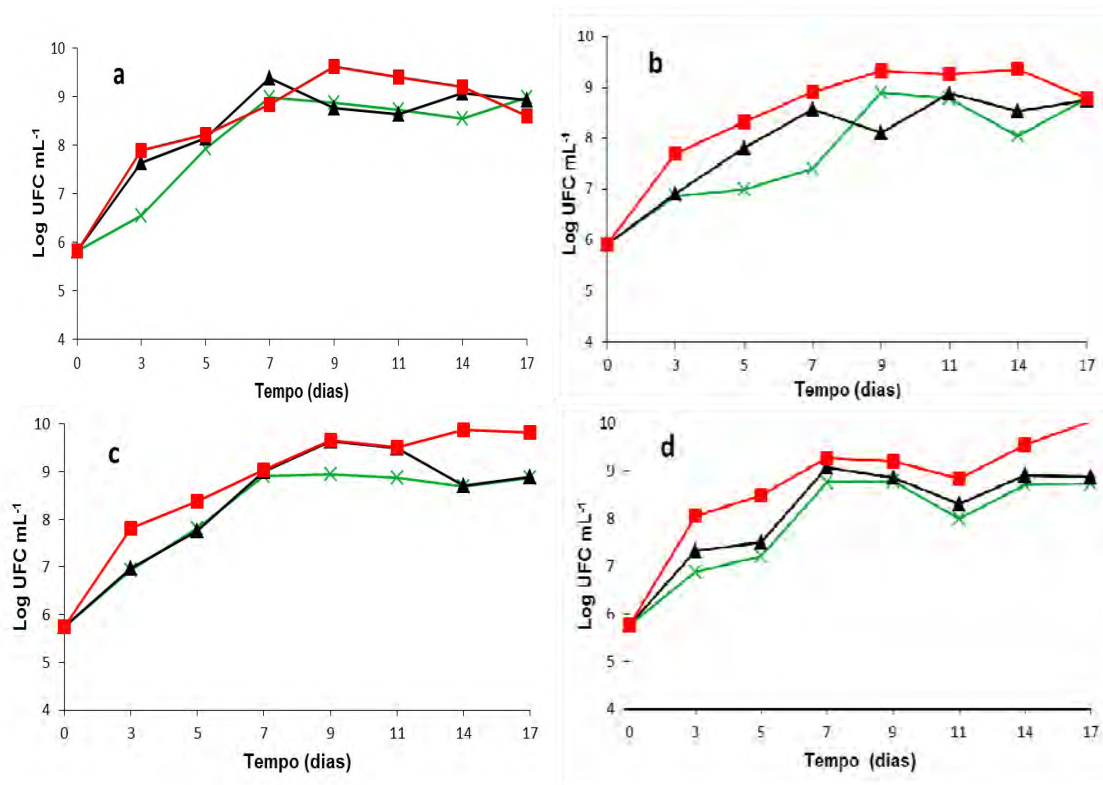


Figura 4 – Multiplicação dos isolados 04A (a), 06D (b), *P. fluorescens* 07A (c) e 011A (d) em leite desnatado reconstituído nas temperaturas de refrigeração 4 °C (—x—), 7 °C (—▲—), 10 °C (—■—)

Durante o monitoramento da multiplicação da *P. fluorescens* 07A (Figura 4c) observou-se também um comportamento muito semelhante ao das demais bactérias estudadas, este comportamento pode ser explicado pelo fato de serem todas psicrotróficas proteolíticas, levando a um comportamento semelhante durante as diferentes fases de crescimento. A *P. fluorescens* 07A não apresentou um crescimento distinto nas três temperaturas. Com 7 d de incubação a bactéria 07A já havia atingido um número de células viáveis de 10^8 UFC mL⁻¹ para todas as temperaturas. Pinto (2004) encontrou resultados semelhantes ao analisar grau de proteólise em leite por *P. fluorescens* 07A a diferentes temperaturas de refrigeração; a 4 °C o isolado 07A atingiu uma população de 10^8 UFC mL⁻¹ em oito dias, indicando que a temperatura de estocagem do leite a 4 °C não é suficiente para evitar a multiplicação desse gênero de bactérias.

A multiplicação da bactéria 11A foi também semelhante ao das demais (Figura 4d). Na temperatura de 10 °C houve uma maior multiplicação desta bactéria do que quando incubada nas temperaturas de 4 e 7 °C, sendo que no sétimo dia a mesma já havia atingido uma concentração de células de aproximadamente 10^9

UFC mL⁻¹, um aumento de três ciclos logarítmicos em relação à concentração inicial. Esta concentração de células se manteve estável até o décimo sétimo dia para as temperaturas de 4 e 7 °C.

Embora tenha havido diferença na velocidade de multiplicação das quatro bactérias avaliadas entre temperaturas, esta diferença não foi pouco acentuada. A diferença entre de multiplicação nas três temperaturas, provavelmente, seria mais bem caracterizada se a inoculação inicial das bactérias fosse em menor concentração. Pinto (2004) que obteve diferença nítida na multiplicação entre temperaturas de refrigeração com os isolados de *P. fluorescens* 07A e 041 com inoculação inicial de, aproximadamente, 10⁴ UFC mL⁻¹ monitorado em intervalos de um dia.

Os resultados indicam que se as boas práticas agropecuárias não forem empregadas pode levar a uma contaminação inicial elevada no leite cru por esse grupo de micro-organismos, promovendo um aumento da população durante o armazenamento refrigerado para valores que irão causar prejuízos econômicos e tecnológicos à indústria de laticínios, mesmo quando for estocado a 4 °C.

Santos et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes com a inoculação de *P. fluorescens* em leite *in vitro*; foi feito o monitoramento do crescimento nas temperaturas de 4, 7, e 10 °C por 120 h e observou-se um comportamento muito semelhante do micro-organismo nas três temperaturas. Entretanto, na temperatura de 10 °C e estocagem por 120 h a população de micro-organismos foi de 10⁸ UFC mL⁻¹, nas temperaturas de 4 e 7 °C com uma contaminação inicial de 5,0x10⁵ UFC mL⁻¹, a população desses micro-organismos ultrapassou 10⁷ UFC mL⁻¹ a partir de 48 h de estocagem.

Gloria et al (2010) observaram em seu estudo um maior número de UFC de *P. fluorescens* em leite cru a temperatura de 10 °C do que nas temperaturas de 4 e 7 °C; com uma concentração inicial de 10³ UFC mL⁻¹ à temperatura de 4 °C em 6 d de estocagem a população atingiu uma contagem de 10⁶ UFC mL⁻¹ para leite cru e esterilizado.

Haryani et al. (2003) estudando a produção de proteases por bactérias psicrotóricas em leite cru sob temperatura de refrigeração observaram que a temperatura influencia diretamente na multiplicação desse grupo de micro-organismos, sendo que o tempo necessário para que a população de psicrotóxicos

atingisse 10^7 UFC mL⁻¹ à 2, 4 e 7 °C foi de nove, sete e quatro dias, respectivamente.

6.2 Monitoramento da atividade proteolítica em LDR 12%

A atividade proteolítica das bactérias previamente isoladas de leite cru (04A, 06D, 07A e 11A), em meio de cultura foi verificada pela formação de halo em ágar leite nas temperaturas de 7 e 21 °C conforme apresentado na Figura 5.

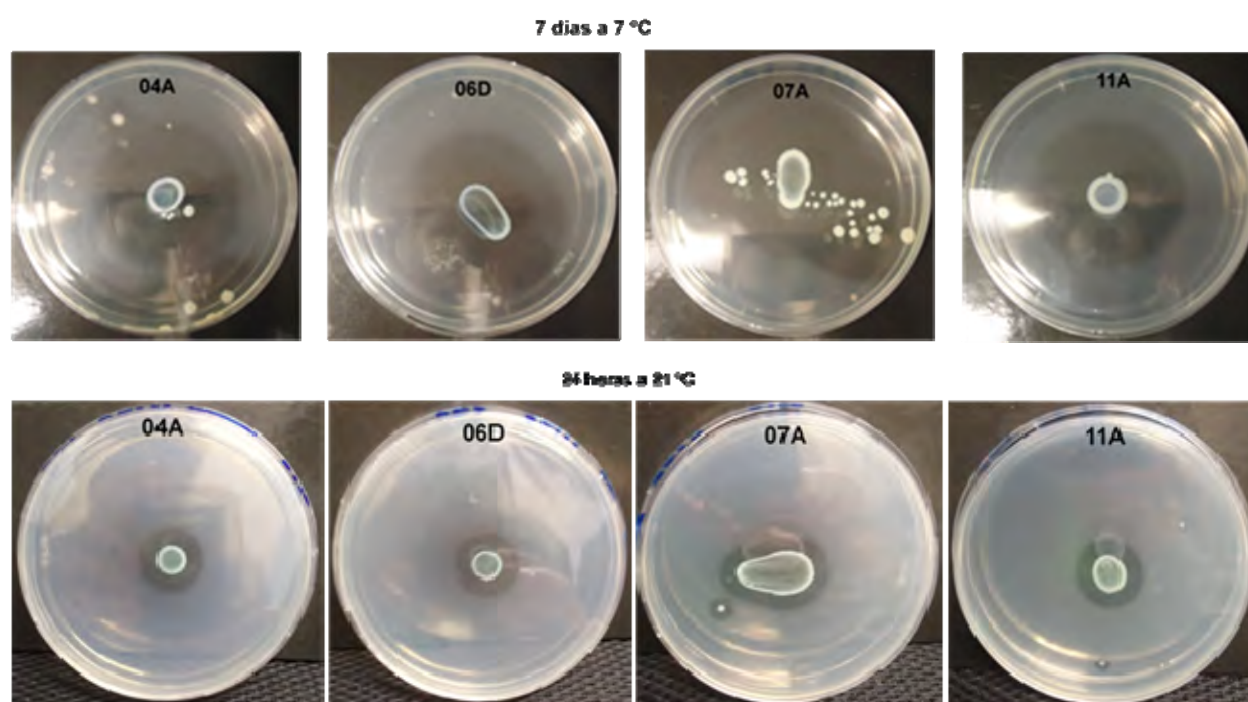


Figura 5 – Atividade proteolítica das bactérias em ágar leite a 7 °C por 7 d e 21 °C por 24 h.

Os resultados obtidos evidenciam a atividade proteolítica das bactérias pelo surgimento de um halo translúcido ao redor de cada colônia resultante da hidrólise da caseína presente no meio utilizado. Essas enzimas proteolíticas são associadas a uma série de problemas de deterioração em leite e derivados lácteos que afetam a qualidade e a vida útil desses produtos (DUFOUR et al., 2008; NÖRNBERG et al., 2009; MU et al., 2009).

6.3 Ensaio de proteólise em LDR 12%

Não foi observada alteração no perfil eletroforético das proteínas na amostra controle, contendo apenas LDR 12%, incubado a 21 °C pelo período de até sete dias (Figura 6), assim os demais resultados obtidos foram comparados com esta amostra controle.

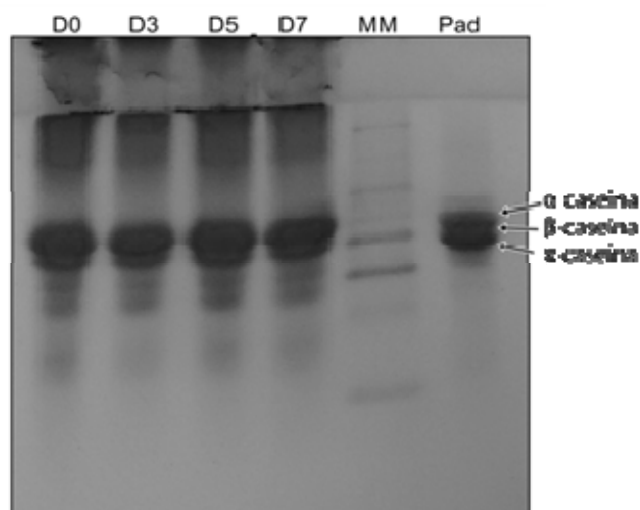


Figura 6 – Amostra controle (LDR 12% estéril) incubada a 21 °C. 1) D0 – LDR no tempo 0; 2) D3 – LDR após 3 d de incubação; 3) D5 – LDR após 5 d de incubação; 4) D7 – LDR após 7 d de incubação; 5) MM - Marcador de Peso Molecular; 6) Pad – Padrão de Peso molecular das frações de caseína (α , β e κ -caseína).

O efeito da multiplicação do isolado (04A) inoculada no LDR sobre as frações de caseína foi evidente, mostrando uma maior atividade proteolítica com o aumento da temperatura de refrigeração e do tempo de armazenamento (Figura 7). A incubação do isolado 04A a 4 °C mostrou alterações nas frações de caseína, principalmente com 7 d de incubação, indicando que o armazenamento do leite a essa temperatura já pode ser considerado preocupante por permitir a multiplicação de bactérias psicrotróficas, a produção e a atividade de proteases. Com o aumento da temperatura para 7 °C houve uma maior degradação das frações de caseína e, no quinto dia de estocagem, foi possível observar um grau de hidrólise mais intenso principalmente das frações β e κ -caseína, frações mais susceptíveis à ação de enzimas proteolíticas produzidas por micro-organismos psicrotróficos (DATTA & DEETH, 2001; LAW et al., 1997; DRIESSEN e STADHOUDERS, 1979; KOHLMANN, 1979). Além disso, observou-se o aparecimento de peptídeos com maior mobilidade eletroforética resultantes dessa degradação à medida que as frações de caseínas foram hidrolisadas. A 10 °C a intensidade da degradação das diferentes frações proteicas foi ainda maior, sendo que no terceiro dia verificou-se a hidrólise das frações β e κ -caseína e no quinto dia já houve degradação completa de todas as frações de caseínas da alíquota utilizada, embora na análise visual após 10 d (Figura 8) tenha-se observado que o leite ainda demonstrava que parte das caseínas estavam intactas percebendo-se uma dispersão coloidal no leite.

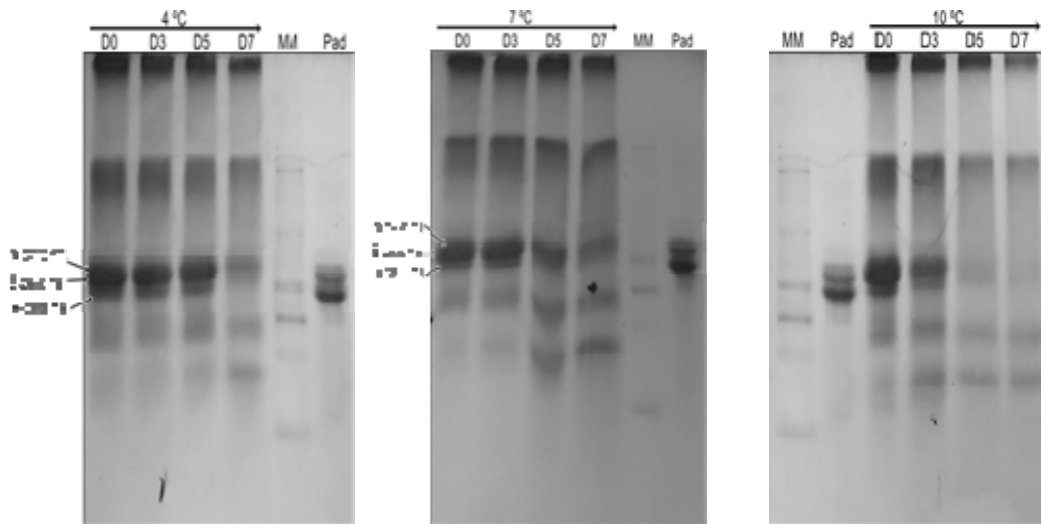


Figura 7 – Amostras contendo a bactéria psicrotrófica proteolítica 1 (04A) incubada a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. 1) D0 – LDR + 04A no tempo 0; 2) D3 – LDR + 04A após 3 d de incubação; 3) D5 – LDR + 04A após 5 d de incubação; 4) D7 – LDR + 04A após 7 d de incubação; 5) MM - Marcador de Peso Molecular; 6) Pad – Padrão de Peso molecular das frações de caseína (α , β e κ -caseína).

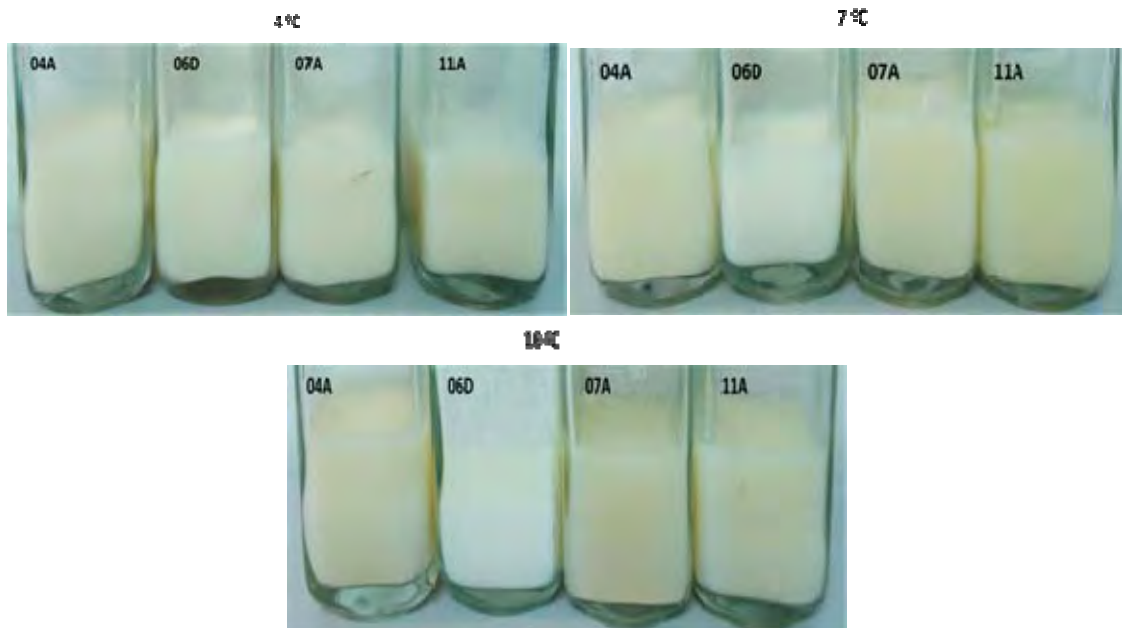


Figura 8 – Aspecto visual das amostras inoculadas com as quatro bactérias nas diferentes temperaturas de incubação, após 10 d.

Constatou-se baixo grau de hidrólise das proteínas nas amostras inoculadas com o isolado 06D nas três temperaturas de incubação (Figura 9). Além disso, através da análise visual dos frascos contendo esta bactéria, após 17 d de incubação nas três temperaturas de refrigeração, observou-se grande semelhança com a amostra controle mantida à temperatura de 21 °C durante este tempo, sendo

notada pouca alteração de cor desta amostra quando comparada com os leites inoculados com as outras três bactérias utilizadas, a 04A, 07A e 11A (Figura 10).

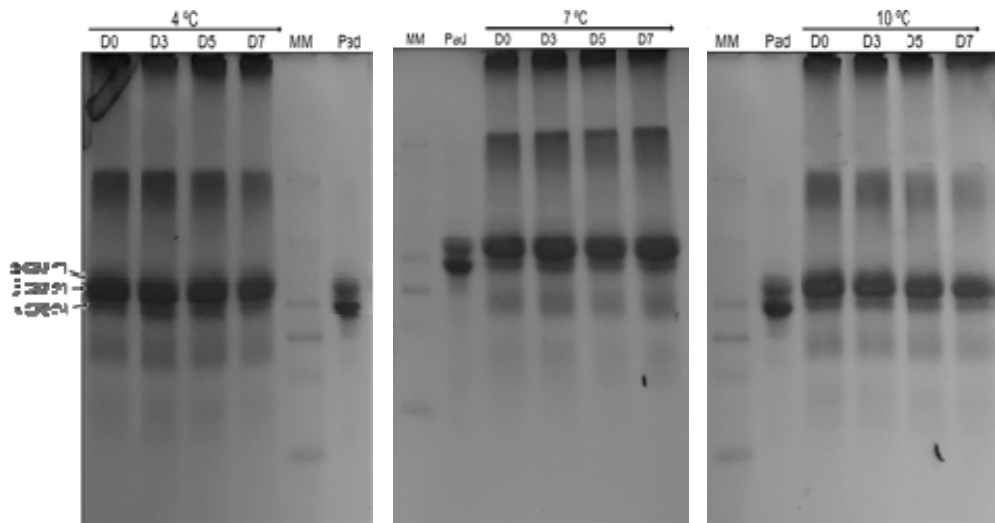


Figura 9 – Amostras contendo a bactéria psicrotrófica proteolítica 2 (06D) incubada a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. 1) D0 – LDR + 06D no tempo 0; 2) D3 – LDR + 06D após 3 d de incubação; 3) D5 – LDR + 06D após 5 d de incubação; 4) D7 – LDR + 06D após 7 d de incubação; 5) MM - Marcador de Peso Molecular; 6) Pad – Padrão de Peso molecular das frações de caseína (α , β e κ -caseína).

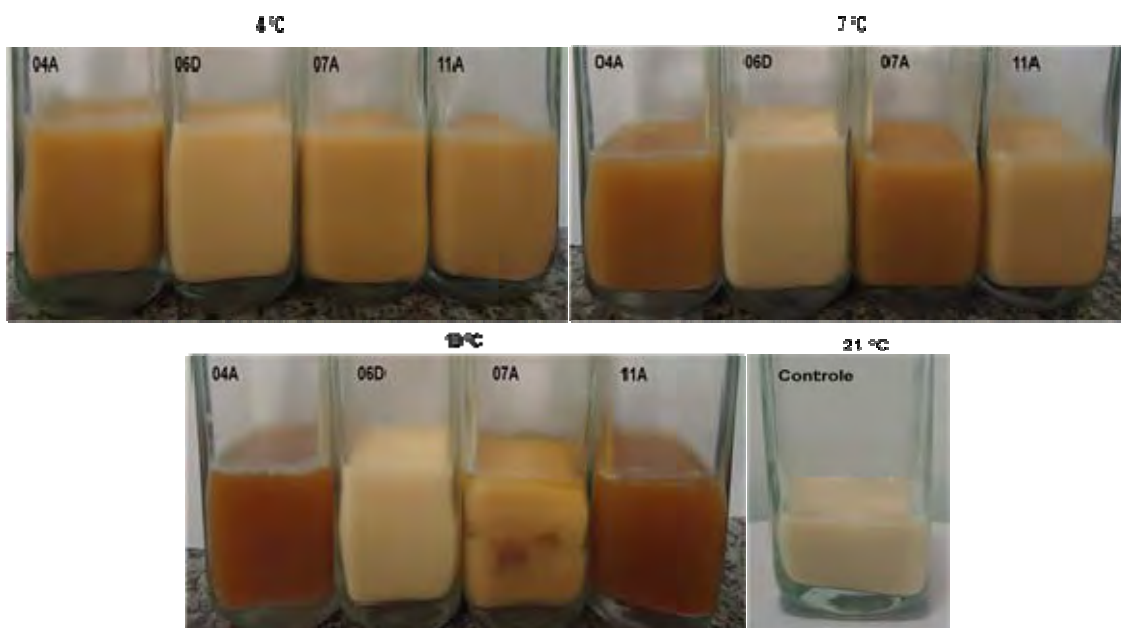


Figura 10 – Aspecto visual das amostras inoculadas com as quatro bactérias e da amostra controle (LDR 12%) nas diferentes temperaturas de incubação, após 17 d.

Apesar do isolado 06D ter demonstrado capacidade proteolítica em ágar leite (Figura 5), no LDR 12% a mesma não apresentou capacidade de degradar as

frações de caseína nas condições experimentais. A atividade proteolítica dessa bactéria pode ter sido prejudicada devido às alterações ocorridas no leite nos intensos tratamentos térmicos. A desnaturação da β -lactoglobulina pelo calor propicia a reação com a κ -caseína (DONATO et al., 2007) podendo dificultar o acesso ao sítio catalítico da enzima.

Foi possível notar nas Figuras 11 e 12 que o efeito da multiplicação da *P. fluorescens* 07A e do isolado 11A sobre as frações de caseínas foi muito semelhante, ocorrendo intensificação da degradação dessas frações com o aumento da temperatura e do tempo de estocagem. Esse resultado foi semelhante ao observado com o isolado 04A. A 7 °C, a amostra inoculada com *P. fluorescens* 07A mostrou um grau de proteólise ligeiramente maior que aquela inoculada com a bactéria 11A, observando-se o surgimento de peptídeos resultantes da degradação das frações de caseínas no sétimo dia. O aumento da temperatura de incubação para 10 °C acelerou o processo de hidrólise, sendo que a amostra incubada com a bactéria 11A mostrou-se mais degradada após 5 d de incubação onde todas as frações já estavam quase completamente hidrolisadas.

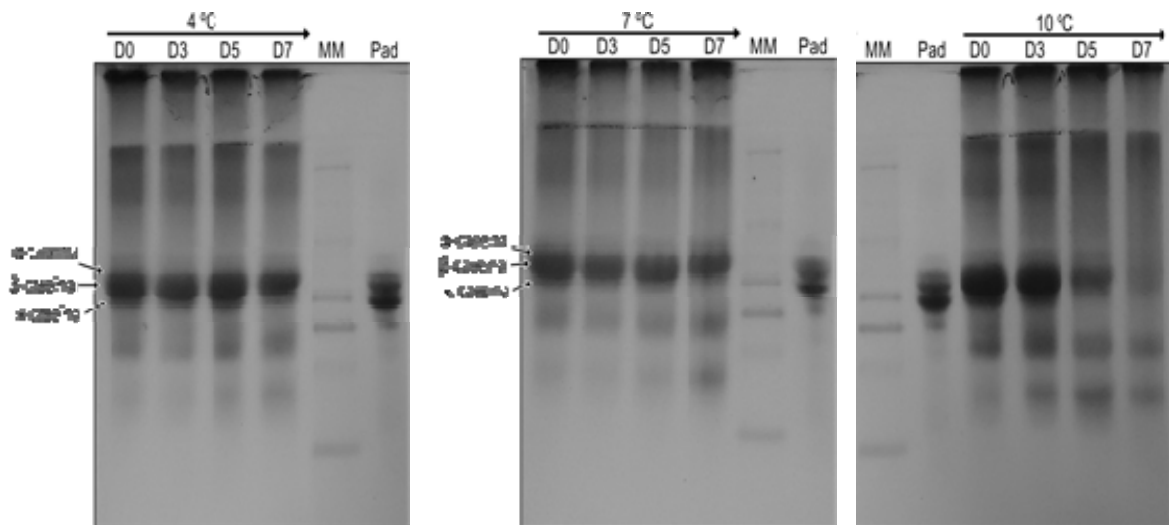


Figura 11 – Amostras contendo a bactéria psicrotrofica proteolítica 3 (07A) incubada a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. 1) D0 – LDR + 07A no tempo 0; 2) D3 – LDR + 07A após 3 d de incubação; 3) D5 – LDR + 07A após 5 d de incubação; 4) D7 – LDR + 07A após 7 d de incubação; 5) MM - Marcador de Peso Molecular; 6) Pad – Padrão de Peso molecular das frações de caseína (α , β e κ -caseína).

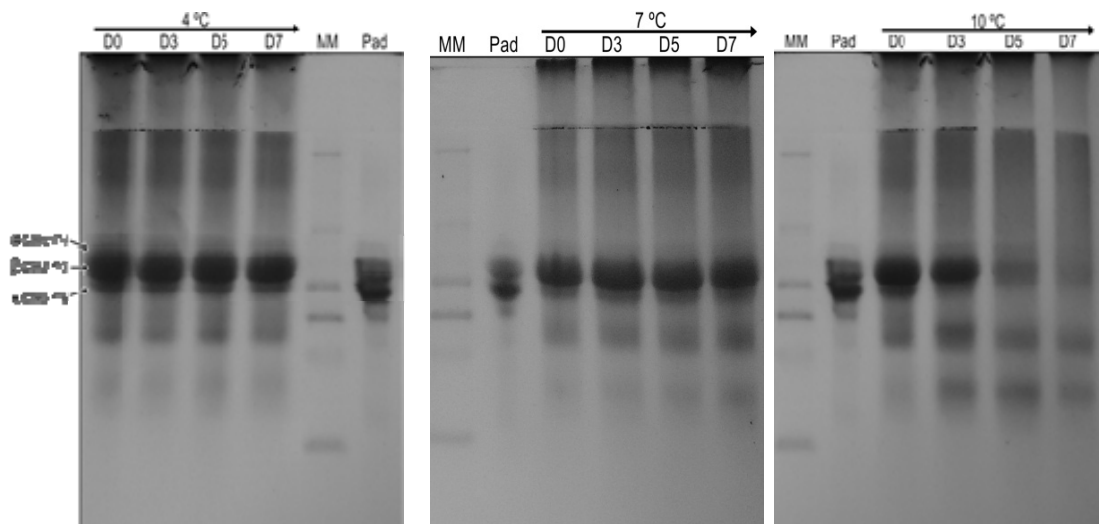


Figura 12 – Amostras contendo a bactéria psicrotrofica proteolítica 4 (11A) incubada a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. 1) D0 – LDR + 11A no tempo 0; 2) D3 – LDR + 11A após 3 d de incubação; 3) D5 – LDR + 11A após 5 d de incubação; 4) D7 – LDR + 11A após 7 d de incubação; 5) MM - Marcador de Peso Molecular; 6) Pad – Padrão de Peso molecular das frações de caseína (α , β e κ -caseína).

Na Figura 10 observou-se diferença na coloração das amostras incubadas com os isolados 04A, 07A e 11A, apresentando um escurecimento à medida que a temperatura de incubação aumentou. O escurecimento do leite é devido a uma reação não enzimática denominada Maillard. Na etapa inicial dessa reação ocorre condensação entre o grupo carboxil da lactose e o grupamento amino da cadeia lateral do resíduo de aminoácido lisina formando o composto intermediário hidroximetilfurfural (HMF). Ao final da reação é formado o composto melanoidina, responsável pela coloração escura (WALSTRA, 2006). É provável que exposição dos aminoácidos devido à proteólise tenha favorecido a reação, resultando na intensificação da cor com aumento do tempo e da temperatura de estocagem do LDR 12% inoculo com os isolados psicrotrofos.

A multiplicação das bactérias psicrotrofos proteolíticas no leite e a ação de suas enzimas sobre as frações de caseína, demonstraram que as temperaturas de resfriamento do leite recomendadas pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011) durante a estocagem do leite cru na propriedade rural e no transporte granelizado não impedem a multiplicação desse grupo de bactérias e a atividade de suas enzimas, podendo resultar em perda da qualidade de leite dos produtos lácteos.

6.4 Monitoramento microbiológico

6.4.1 Leite antes da microfiltração

Os resultados das contagens microbiológicas e de células somáticas no leite cru são mostrados na Tabela 2. O leite cru coletado para este experimento apresentou adequação em relação contagem de mesófilos aeróbicos, valor inferior a $6,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), embora possa ser considerado elevado para um leite coletado no momento da ordenha em um circuito mecanizado. O número da contagem de células somáticas estava com valores superiores a 600.000 células por mL, valor máximo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2011). Os valores de micro-organismos psicotróficos na ordem de 10^2 UFC mL⁻¹ podem ser considerados baixos, uma vez que o leite não havia sido mantido refrigerado até o momento da inoculação da estirpe psicotrófica em estudo. A contaminação por esporos também foi baixa, oriunda provavelmente da alimentação dos animais com silagem, que constitui uma fonte potencial de contaminação do leite (FURTADO, 2007).

A obtenção do leite desnatado (LD) resultou em aumento de todos os parâmetros microbiológicos mensurados. Durante a centrifugação para retirada da gordura o leite foi colocado em um tanque que alimenta a desnatadeira contendo água industrial, assim que o nível de água foi esgotado no tanque, o leite foi adicionado havendo contato com pouco de água ainda restante. Essa é provável fonte de contaminação, além da plataforma de recepção ser exposto ao ar do ambiente externo. O leite desnatado pasteurizado (LDP) teve o resultado microbiológico afetado pela qualidade do leite desnatado, embora os valores microbiológicos estivessem em adequação a IN nº 62 (BRASIL, 2011). A contaminação por esporos e micro-organismos termodúricos fez com que o leite apresentasse contagem de esporos superior ao leite cru (Tabela 2), mas micro-organismos psicotróficos não foram detectados nas diluições plaqueadas. A contagem inicial de psicotróficos era o parâmetro microbiológico de maior interesse no leite pasteurizado, uma vez que uma contagem inicial poderia interferir nos resultados.

Tabela 2 - Avaliação microbiológica das amostras antes da inoculação da *P. fluorescens* 041

Amostra	LC		LD		LDP	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
Mesófilos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	4,2	0,5	4,9	0,5	2,5	0,9
Psicrotróficos log UFC mL ⁻¹	2,8	0,5	4,7	0,4	< 1	–
Esporos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	1,8	0,3	2,5	0,8	2,2	1,0
Células Somáticas mL ⁻¹	925000	229128				

LC = Leite Cru; LD = Leite Desnatado; LDP = Leite Desnatado Pasteurizado

As análises microbiológicas do LDP após inoculação da *P. fluorescens* 041 estão na Tabela 3. A concentração inicial de bactérias psicrotróficas foi de, aproximadamente, 10⁴ UFC mL⁻¹ nos três latões em cada temperatura a ser estudada. As contagens de mesófilos aeróbicos e esporos também foram similares entre as amostras de leite dos latões, uma vez que o leite inicial foi submetido aos mesmos procedimentos de preparo até a inoculação de estipe psicrotrófica.

Tabela 3 - Avaliação microbiológica após inoculação da *P. fluorescens* 041 nos leites desnatado pasteurizados antes da incubação a 4, 7 e 10 °C

Amostra	LDP+PF 4 °C		LDP+PF 7 °C		LDP+PF 10 °C	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
Mesófilos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	4,4	0,7	4,3	0,6	4,4	0,6
Psicrotróficos log UFC mL ⁻¹	4,1	0,8	4,1	0,6	4,2	0,5
Esporos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	2,4	1,0	2,4	0,2	2,1	0,5

LDP+PF = Leite Desnatado Pasteurizado inoculado com *P. fluorescens* 041

O LDP após a inoculação da estirpe psicrotrófica ficou armazenado a 4, 7 e 10 °C por 48 h sendo os resultados microbiológicos mostrados na tabela 4. Houve um aumento superior a dois ciclos logarítmicos nas amostras mantidas nas três temperaturas de pré-incubação para contagem final de bactérias psicrotróficas. Maiores valores nas contagens com aumento na temperatura de pré-incubação também foi observado. As contagens de mesófilos aeróbicos também apresentaram aumento superior a dois ciclos logarítmicos nas três temperaturas de pré-incubação, sendo maior com aumento da temperatura de pré-incubação. Embora as contagens de psicrotróficos tenham aumentado com incremento na temperatura de pré-incubação, essa diferença foi menor que a observada nas mesmas temperaturas de pré-incubação no controle positivo (Tabela 5), que diferiu em aproximadamente um ciclo logarítmico no incremento na temperatura de pré-incubação. Esta diferença

observada entre as contagens finais de psicotróficos pode ser porque o leite, após a pasteurização, foi resfriado a uma temperatura de 10 °C nos três latões que iriam ser inoculados com a *P. fluorescens* 041, sendo essa a temperatura mínima possível com sistema de refrigeração indireto utilizado. Enquanto, o leite utilizado no controle positivo foi manipulado a 7 °C. O tempo em que os latões demoraram para alcançar as temperaturas de 7 e 4 °C provavelmente contribuiu para menor diferença no número de unidades formadoras de colônias de psicotróficos entre as três temperaturas de pré-incubação.

Tabela 4 - Avaliação microbiológica 48 h após inoculação da *P. fluorescens* 041 no LDP mantido refrigerado a 4, 7 e 10 °C

Amostra	LDP+PF 4 °C		LDP+PF 7 °C		LDP+PF 10 °C	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
Mesófilos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	6,8	–	7,1	0,1	7,3	0,1
Psicotróficos log UFC mL ⁻¹	6,2	–	6,5	0,1	6,7	0,1
Esporos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	2,4	0,9	2,6	0,9	1,4	1,5

LDP+PF = Leite Desnatado Pasteurizado inoculado com *P. fluorescens* 041

Para comparar aos resultados obtidos na avaliação do leite desnatado pasteurizado microfiltrado foi realizado o monitoramento da multiplicação da estirpe *P. fluorescens* 041 em leite desnatado pasteurizado não sendo realizada a etapa de microfiltração, este foi o controle positivo. Ao leite também foi inoculado com, aproximadamente, 10⁴ UFC mL⁻¹ da bactéria e foi pré-incubado por 48 h nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C. As análises microbiológicas do leite desnatado pasteurizado antes e após a inoculação e também após a pré-incubação por 48 h podem ser observados na tabela 5. Depois do tempo de pré-incubação todos os frascos foram transferidos para uma mesma BOD a 7 °C por mais 7 d.

Tabela 5 - Análises microbiológicas do LDP controle positivo até às 48 horas de pré-incubação

Amostra	LDP	LDP +PF41 ^a	LDP+PF 4 °C ^b	LDP+PF 7 °C ^b	LDP+PF 10 °C ^b
Mesófilos aeróbicos log UFC mL ⁻¹	2,9	4,3	5,8	7,2	8,0
Psicotróficos log UFC mL ⁻¹	2,4	3,8	5,2	6,0	7,6

^a LDP (Leite Desnatado Pasteurizado) após inoculação *P. fluorescens* 041

^b LDP (Leite Desnatado Pasteurizado) inoculado com *P. fluorescens* 041 após 48 horas pré-incubação

Os valores de contagem de mesófilos aeróbicos e psicotróficos apresentaram diferença de, aproximadamente, 1 ciclo logarítmico à medida que a temperatura de

pré-incubação aumentou, ao contrário do leite desnatado pasteurizado para a microfiltração. Os leites pasteurizados inoculados com *P. fluorescens* 041 foram colocados em garrafas de diluição e pré-incubados por 48 h. Já as amostras de leite que foram microfiltradas, a pré-incubação foi em latões de 50 litros e a temperatura mínima alcançada durante o resfriamento após a pasteurização foi 10 °C, provavelmente demorando mais tempo para abaixar a 4 e 7 °C, pelo maior volume de leite, levando maior tempo para troca térmica. As diferenças nos procedimentos adotados, recipientes e temperatura inicial de incubação dos leites é a provável causa da diferença nas contagens.

Pinto (2004) encontrou diferença na taxa de multiplicação da estirpe de *P. fluorescens* 041 inoculada em LDR 12% mantidas a 2, 4, 7 e 10 °C já no segundo dia de estocagem, sendo os leites monitorados até o décimo dia. As contagens foram aproximadamente $5,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ a 2, 4, 7 e 10 °C respectivamente.

Cousin e Marth (1977) monitoraram amostras de leite refrigerado coletadas de tanques coletivos com contaminação inicial de bactérias psicrotróficas próxima a 10^4 UFC mL⁻¹ mantidos entre 5 e 10 °C. Assim como neste trabalho, com apenas dois dias, a 7 °C, a contagem de psicrotróficos foi superior a 10^6 UFC mL⁻¹ e a 10 °C apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC mL⁻¹. Os autores recomendaram que, para evitar alterações bioquímicas no leite, a contagem de bactérias psicrotróficas deve ser inferior a 10^6 UFC mL⁻¹.

6.4.2 Leite desnatado pasteurizado microfiltrado

O LDPM foi analisado quanto à presença de bactérias mesófilas aeróbicas e psicrotróficos até o tempo 45 d e de esporos aeróbicos após a microfiltração. Foi observada no tempo zero após a microfiltração uma redução logarítmica de 6,9, 7,1 e 7,3 de mesófilos aeróbicos, de 6,2, 6,5 e 6,7 de psicrotróficos e de 2,8, 3,0, e 2,1 de esporos aeróbicos nos leites pré-incubados a 4, 7 e 10 °C, respectivamente. Na avaliação do tempo de prateleira de leite microfiltrado (SILVEIRA et al., 2010) obtiveram uma redução decimal de 7,4, 5,8 e 4,4 de mesófilos aeróbicos, coliformes totais e *Staphylococcus* sp., respectivamente, de uma amostra de leite cru, microfiltrado com membrana de tamanho de poro 0,8 µm. Resultados semelhantes de redução de mesófilos aeróbicos foram encontrado por Dias (2011), em seu trabalho com produção de queijos com olhaduras a partir de leite microfiltrado. A

autora obteve uma redução decimal de 6,5, 5,4 e 4,0 de mesófilos aeróbicos, coliformes totais e esporos de *Clostridium* sp., respectivamente.

O resultado das contagens de mesófilos aeróbicos ao longo de 45 d podem ser visualizados na Tabela 6. Pode-se observar que houve contagem no tempo 5 d para o leite pré-incubado a 4 °C e uma contaminação no tempo 10 d para o leite com pré-incubação da 7 °C , enquanto para a temperatura de 10 °C houve contaminação nos tempos 3, 7, 10 e 15 d. Embora nos leites das três temperaturas de pré-incubação tenha ocorrido contaminação em alguns dos dias, o valor foi sempre inferior a 3 ciclos logarítmicos, não sendo suficiente para alterar as características físico-químicas avaliadas no leite microfiltrado.

Tabela 6 - Contagem média de mesófilos aeróbicos obtida de três repetições no leite desnatado pasteurizado microfiltrado monitorado durante 45 d

Temperatura	Log UFC mL ⁻¹											
	Tempo (dias)											
	0	3	5	7	10	15	20	25	30	35	40	45
4 °C	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 °C	0	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0
10 °C	0	0,9	0	1,4	2,8	2,7	0	0	0	0	0	0

Os resultados das contagens de bactérias psicrófilas são mostrados na Tabela 7. Ocorreu contaminação no leite pré-incubado a 4 °C no tempo 5 d. Para o leite pré-incubado a 7 °C ocorreu contaminação nos dias 3, 7 e 10 e para o leite pré-incubado a 10 °C nos tempos 7, 10, 15, 35 e 40 d. Assim como na contagem de mesófilos aeróbicos a contaminação foi sempre inferior a três ciclos logarítmicos, resultado que não foi suficiente para alterar as propriedades físico-químicas avaliadas no leite no período de 45 d.

Tabela 7 - Contagem média de bactérias psicrófilas obtida de três repetições no leite desnatado pasteurizado microfiltrado monitorado durante 45 d

Temperatura	Log UFC mL ⁻¹											
	Tempo (dias)											
	0	3	5	7	10	15	20	25	30	35	40	45
4 °C	0	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 °C	0	0,6	0	1,4	2,2	0	0	0	0	0	0	0
10 °C	0	0	0	2,0	2,9	1,2	0	0	0	1,0	2,7	0

A microfiltração do leite contendo a *P. fluorescens* 041 mostrou-se eficiente na eliminação da bactéria, como pode ser observado no tempo zero das Tabelas 6 e 7. Embora nas análises microbiológicas do leite microfiltrado ao longo do tempo tenham demonstrado contaminações, em dias posteriores a contaminação não foi detectada presença de micro-organismos comprovando que esta foi aleatória.

A microfiltração utilizando membrana de 0,8 μm garante que o leite seja considerado comercialmente estéril (CARVALHO e MAUBOIS, 2010). Então, as contaminações obtidas ao longo do tempo foram provavelmente ocasionadas pela qualidade do ar da fábrica no momento da microfiltração.

A qualidade do ar do ambiente de envase foi avaliada por sedimentação de micro-organismos em meio PCA, sendo a média da contagem em diferentes momentos da microfiltração $1,03 \times 10^2 \text{ UFC cm}^{-2} \text{ semana}^{-1}$. É recomendado que a contaminação em ambiente de processamento de alimentos não seja superior a $30 \text{ UFC cm}^{-2} \text{ semana}^{-1}$ (APHA, 1992; citado por ANDRADE, 2008). Durante a microfiltração houve controle rigoroso para evitar circulação de pessoas nas proximidades ao equipamento de microfiltração. No entanto, valores de contaminação acima do recomendado foram observados no leite microfiltrado. O resultado da qualidade do ar sugere que essa é a provável fonte de contaminação, já que o envase foi realizado manualmente e, durante o procedimento, as embalagens ficam expostas a deposição de partículas. Esse nível de contaminação do ar é uma constatação comum em ambiente de processamento de alimentos (MARTINS et al., 2006b; PINTO, 2009).

O monitoramento de mesófilos aeróbicos do controle positivo (Figura 13) foi realizado até o tempo 7 d após o tempo de pré-incubação. No tempo zero, percebe-se diferença devido às temperaturas de pré-incubação. No tempo 3 d as contagens dos leites pré-incubados a 7 e 10 °C superaram 8 ciclos logarítmicos, enquanto a 4 °C ficou pouco abaixo. A fase estacionária foram atingidas no tempo 5 d dos leites pré-incubados a 7 e 10 °C, quando a população chegou a aproximadamente 9 ciclos logarítmicos, enquanto a 4 °C ainda estava na fase logarítmica permanecendo até o tempo 7 d.

O monitoramento da multiplicação de psicrotrofos pode ser observado na Figura 14. O leite pré-incubado a 10 °C a fase estacionária foi atingida no tempo 3 d, enquanto nos leites pré-incubados a 4 e 7 °C as contagens indicaram permanência em fase logarítmica até o tempo 7 d.

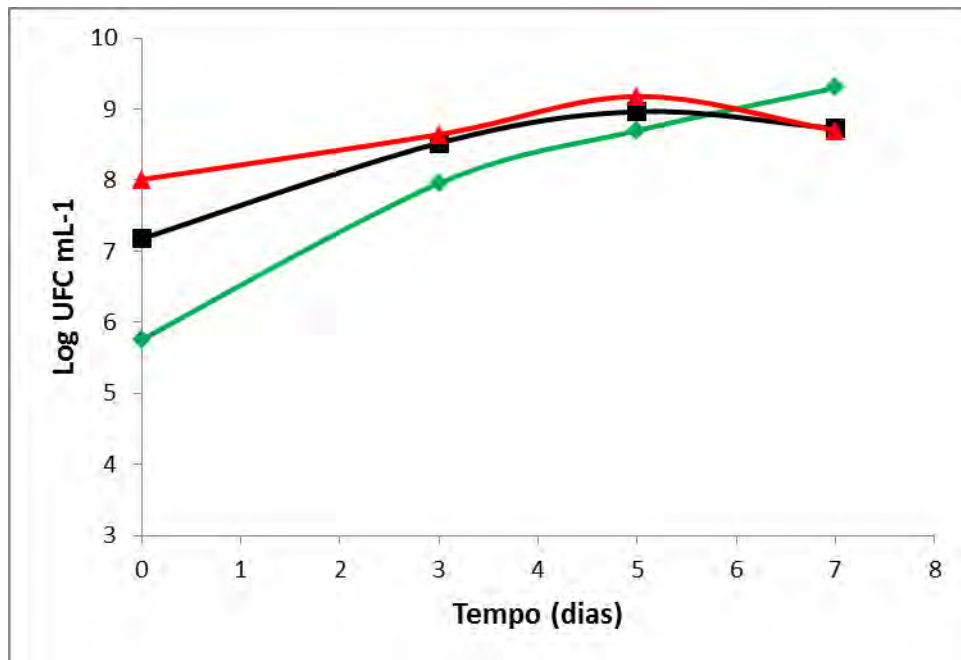


Figura 13 – Contagem de mesófilos aeróbicos da amostra de leite desnatado pasteurizado pré-incubada a 4 °C (◆), 7 °C (▲) e 10 °C (■) por 48 h monitorada durante 7 d

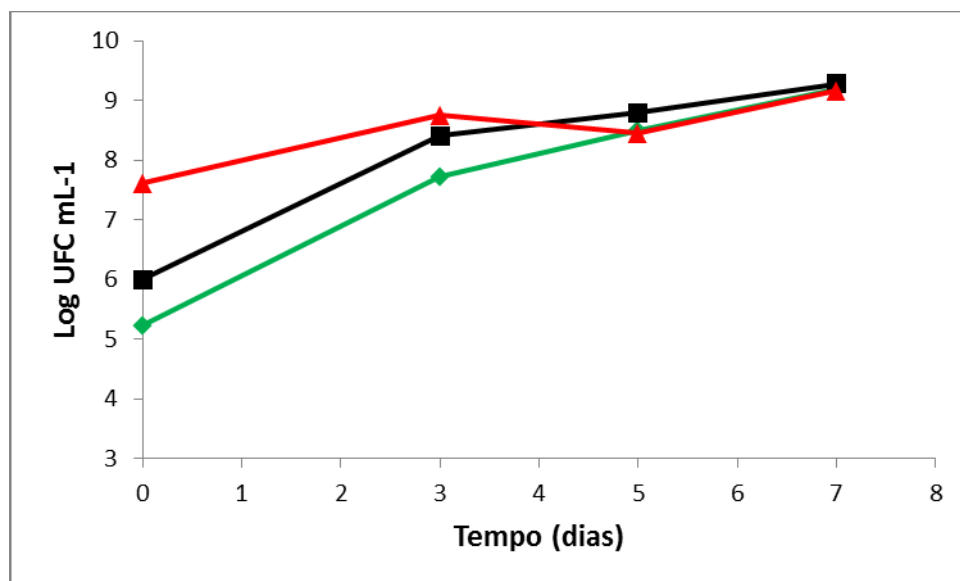


Figura 14 – Contagem de psictróficos da amostra de leite desnatado pasteurizado pré-incubada com *P. fluorescens* 041 a 4 °C (◆), 7 °C (▲) e 10 °C (■) por 48 h monitorada durante 7 d

No controle positivo o monitoramento foi interrompido no sétimo dia, porque havia clara separação de fases e total descaracterização do produto leite nas amostras das três temperaturas de pré-incubação (Figura 20).

6.5 Ensaio de proteólise

A atividade proteolítica em gel de eletroforese nas amostras de LDPM pré-incubados com *P. fluorescens* 041 a 4, 7 e 10 °C por 48 h foi monitorada até o trigésimo dia de estocagem a 7 °C. Como podem ser observados nas Figuras 15, 16 e 17 os géis não ilustram uma relação linear entre intensidade de proteólise e o tempo, nas amostras de leite pré-incubadas nas três temperaturas. As frações α -S2, α -S1, β e κ -caseínas em ordem crescente de mobilidade eletroforética, permanecem visualmente intactas até o tempo trinta dias, resultado confirmado pelos densitogramas da Figura 18.

A técnica de eletroforese SDS-PAGE utilizada neste experimento é a técnica mais extensivamente utilizada para separação de misturas de proteínas baseado na diferença entre suas massas molares. As amostras a serem separadas no por esta técnica são primeiramente submetidas a um banho de água fervendo por 5 min para serem desnaturadas. O mercaptoetanol reduz as pontes de dissulfeto contribuindo para desfazer a estrutura terciária das proteínas. O SDS é um detergente aniônico que se liga fortemente a estrutura desnaturada das proteínas, em média, a cada dois resíduos de aminoácidos conferindo-lhe carga negativa. Isso faz com que toda proteína tenha sempre a mesma relação massa/carga e seja linear já que está desnaturada. Então, a separação das proteínas no gel de eletroforese, quando submetidas a uma diferença de potencial elétrico acontece simplesmente pela diferença que existe no tamanho entre as moléculas, em que as moléculas menores passam mais facilmente pelos poros do gel, enquanto as moléculas maiores sofrem maior resistência friccional (WALKER, 2002).

As quatro principais caseínas do leite são α_{s1} , α_{s2} , β e κ , e representam respectivamente 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas (FOX e MCSWEENEY, 2003) e apresentam as massas molares médias de 23.612, 25.228, 23.980 e 19.000 Da, respectivamente, nas principais variantes genéticas encontradas no leite (FOX, 2009). Então, pela intensidade da banda formada no gel, pela mobilidade eletroforética e com auxílio dos padrões de caseínas as bandas foram identificados no gel. Embora a β -caseína tenha maior massa molar que a α_{s1} -caseína, ela apresenta maior mobilidade eletroforética porque apresenta grande parte de sua superfície hidrofóbica que se liga desproporcionalmente ao SDS (FOX, 2009).

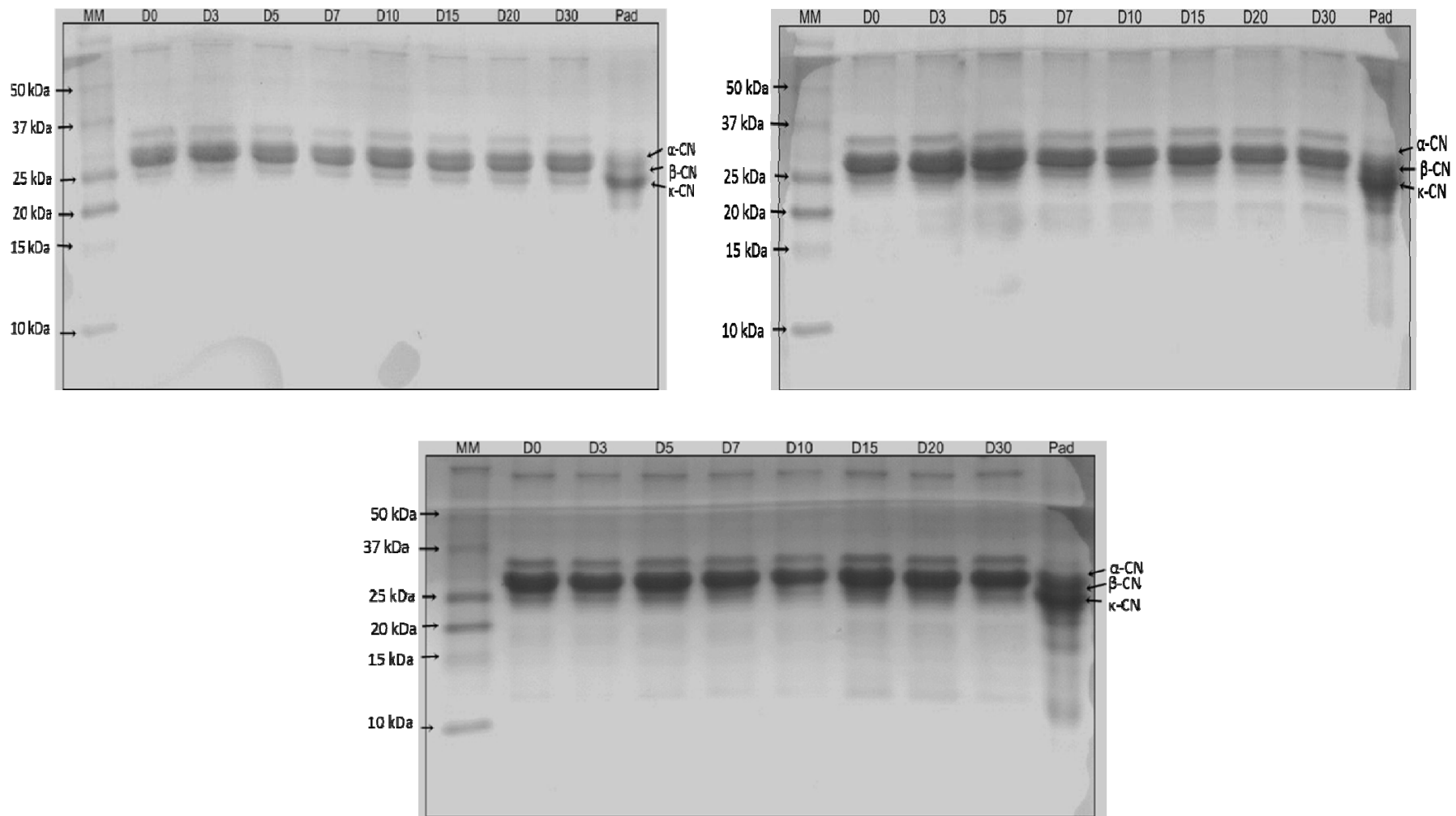


Figura 15 – Leite desnatado pasteurizado pré-incubado por 48 h a 4 °C com *P. fluorescens* 041 e microfiltrado, estocado a 7 °C durante 30 d. Repetições 1, 2 e 3 respectivamente. (D0 dia da microfiltração).

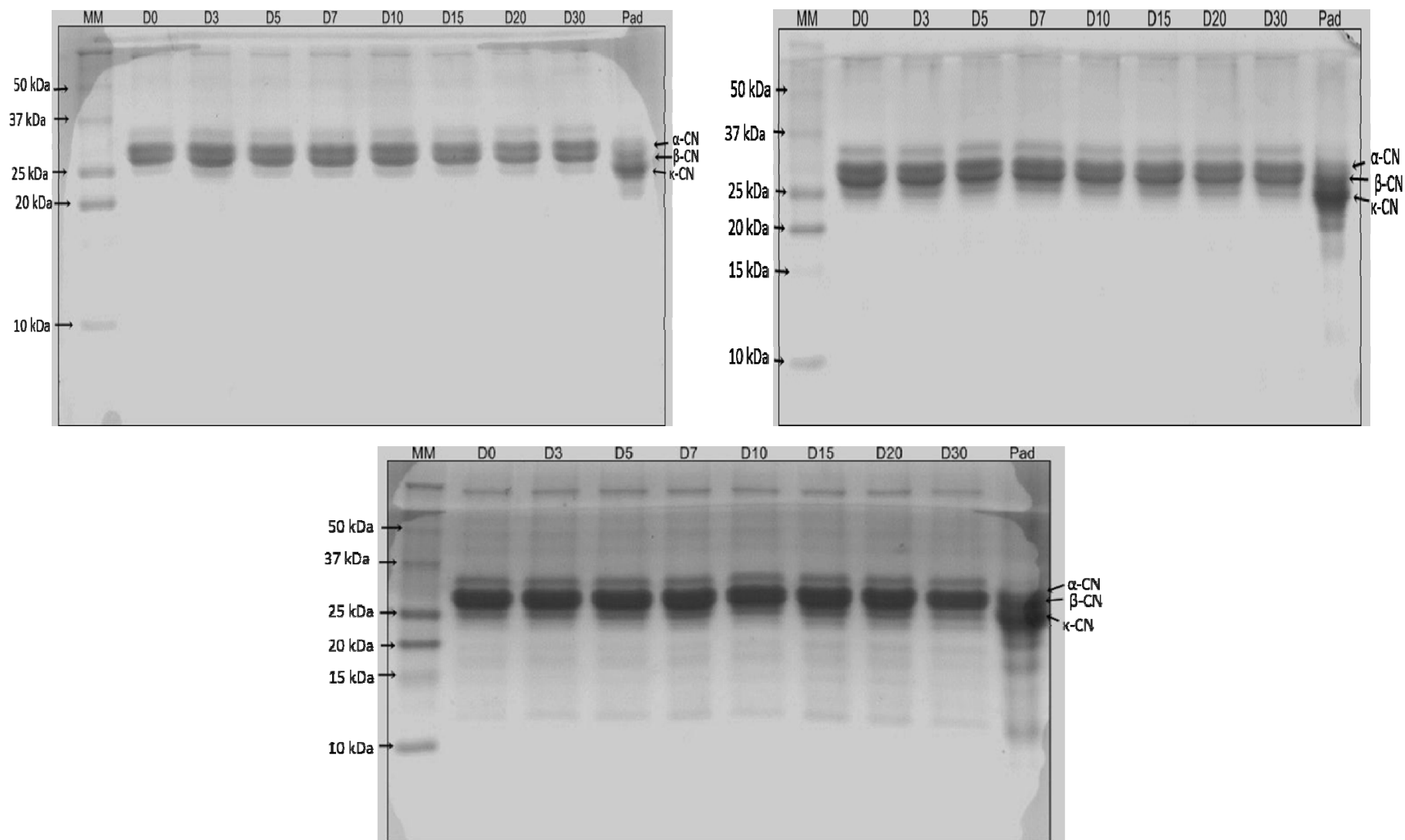


Figura 16 – Leite desnatado pasteurizado pré-incubado por 48 h a 7 °C com *P. fluorescens* 041 e microfiltrado, estocado a 7 °C durante 30 d. Repetições 1, 2 e 3 respectivamente (D0 dia da microfiltração).

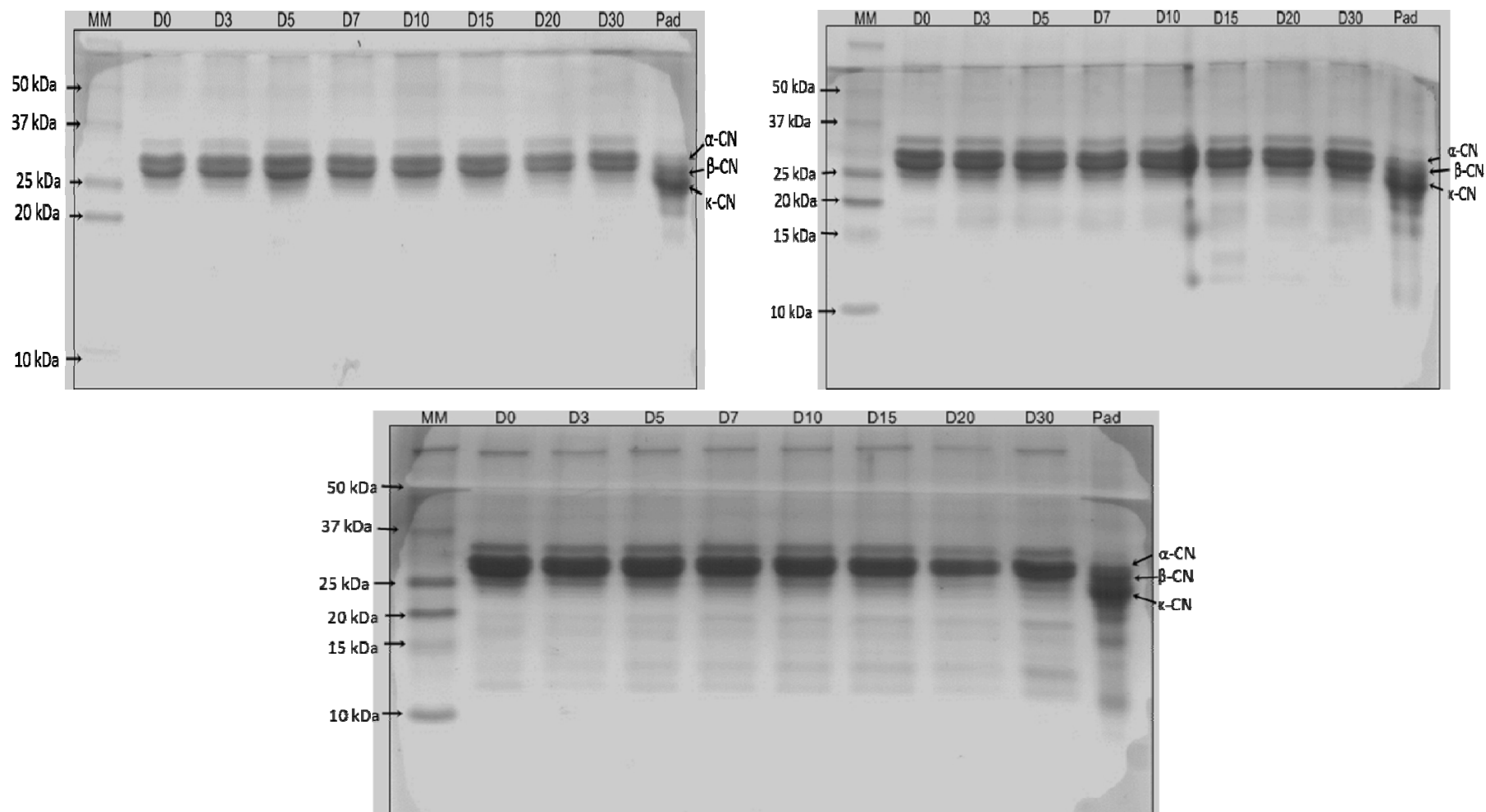


Figura 17 – Leite desnatado pasteurizado pré-incubado por 48 h a 10 °C com *P. fluorescens* 041 e microfiltrado, estocado a 7 °C durante 30 d. Repetições 1, 2 e 3 respectivamente (D0 dia da microfiltração).

O percentual das frações de caseínas remanescente ao longo do tempo pode ser visualizado nos densitogramas da Figura 18. O modelo de segundo grau foi utilizado para tentar explicar as variações no percentual de caseínas. Nas condições experimentais nenhum dos coeficientes da regressão foi significativo ($P > 0,05$) para os resultados do percentual das frações α S2, α -S1 e β -caseínas. Pode-se concluir que com uma contaminação inicial de aproximadamente 10^4 UFC mL⁻¹ de bactérias psicotróficas no leite mantido refrigerado até 48 h como estabelece a IN nº 62 (BRASIL, 2011) no intervalo de temperatura entre 4 e 10 °C e submetido a microfiltração não haveria uma proteólise significativa durante a estocagem do leite sob refrigeração por até 45 d, utilizando técnica de eletroforese SDS-PAGE. Já para fração κ -caseína o modelo de segundo grau apresentou coeficiente significativo ($P < 0,05$) para interação entre a temperatura e o tempo, a equação não foi utilizada porque não há coerência para explicação dos resultados. Com ausência de proteólise no leite microfiltrado não foi possível verificar quais frações de caseínas foram mais susceptíveis ao ataque das proteases da estirpe psicotrófica.

Matta et al. (1997), em estudo de uma técnica para detecção de proteases produzidas por *Pseudomonas* sp. encontrou um limite de detecção 1,01 g mL⁻¹ referente a uma população de aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹, o suficiente para causar redução no tempo de prateleira em leite UHT (RICHARDSON e TE WHAIT, 1978). A Merk company (1999), recomenda para que o leite UHT tenha pelo menos três meses de vida de prateleira, os níveis de proteases devem ser inferiores a 1 g mL⁻¹. Proteólise de leite em estudos com *P. fluorescens* foi detectada quando a população bacteriana era na ordem de 10^4 UFC mL⁻¹ (ADAMS et. al., 1976).

Costa et al. (2002) avaliaram o efeito proteolítico de leite inoculado com uma estirpe de *P. fluorescens* mantido refrigerado a 6 °C e também dos extratos enzimáticos do periplasma e citoplasma da bactéria em estudo. Os autores comprovaram que dentre os extratos enzimáticos, o obtido da região periplasmática foi o principal responsável pela atividade proteolítica e sugeriram que, de alguma forma essas enzimas estariam associadas à membrana da célula bacteriana. As enzimas do citoplasma também apresentaram atividade proteolítica, mas em menor intensidade (COSTA et al., 2002). A partir desse estudo, é possível enfatizar a diferença entre tratamento térmico para eliminação de bactérias e a microfiltração. O tratamento térmico assegura a qualidade microbiológica do produto, mas as bactérias

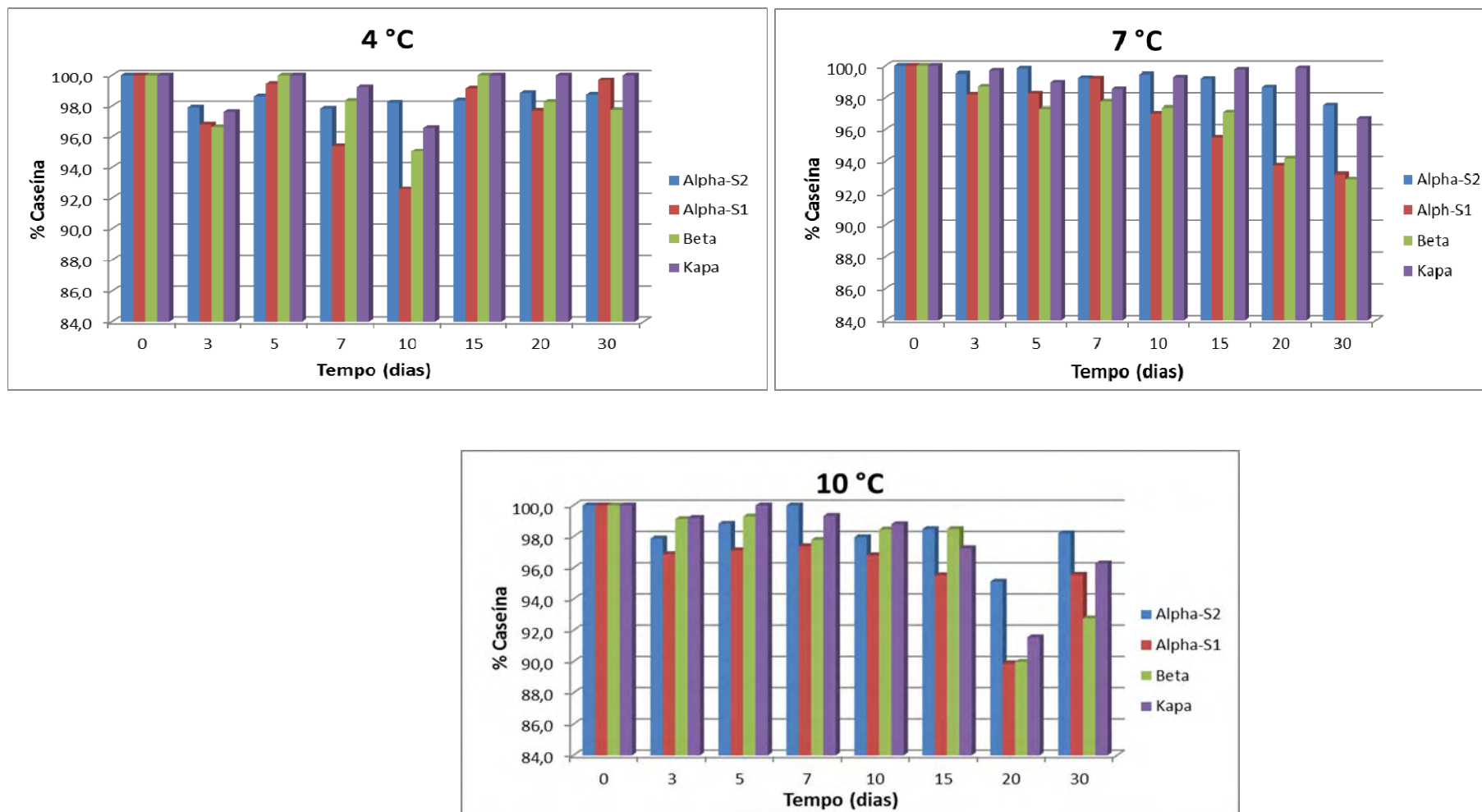


Figura 18 – Média do percentual das frações de caseína no leite desnatado pasteurizado microfiltrado durante 30 d armazenado a 7 °C de três repetições (Leite pré-incubado com *P. fluorescens* 041 a 4, 7 e 10 °C por 48 h).

eliminadas liberam seu potencial enzimático ainda ativo no produto, enquanto a microfiltração remove a bactéria em conjunto com as enzimas que estejam associadas à célula (CARVALHO e MAUBOIS, 2010).

A ausência de proteólise no leite microfiltrado pode ter sido devido à técnica de microfiltração utilizada para remoção da *P. fluorescens* 041. É provável que as proteases exocelulares, facilmente isoladas de *Pseudomonas* ssp. por técnicas de ultracentrifugação e posterior filtragem do sobrenadante (ADAMS et al. 1976; COSTA et al. 2002; BUTTON et al. 2011), não tenham atingido concentração suficiente no leite para degradar as caseínas durante a pré-incubação. As proteases produzidas pela *P. fluorescens* 041 devem ter sido removidas com a bactéria durante a microfiltração. As contagens logarítmicas de 6,22, 6,51 e 6,68 UFC mL⁻¹ de bactérias psicotróficas atingidas neste trabalho nos leites pré-incubados nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C, respectivamente, são níveis de contaminação elevados para uma realidade industrial. Guinot-Thomas et al. (1995) detectaram decréscimo nos níveis de caseínas no quarto dia estocagem do leite cru a 4 °C, quando os níveis de contaminação atingiram entre 10⁶ e 10⁷ UFC mL⁻¹. A contaminação inicial do leite era de 2,0 x 10⁴ UFC mL⁻¹, sendo de 20 a 50% a microbiota psicotrófica (GUINOT-THOMAS et al., 1995).

Kohlmann et al. (1991) estudaram a capacidade de duas espécies de *Pseudomonas* em produzir proteases em temperatura de refrigeração e também a atividade proteolítica das enzimas extracelulares e ligadas a célula bacteriana. A atividade proteolítica em azocaseína foi maior para enzimas extracelulares seguida pela intracelular e as enzimas periplasmáticas não apresentaram atividade. Quando o substrato foi S-2251 (H-D-valina-L-leucina-L-lisina-4-nitroanilida) comumente utilizado para ensaio proteolítico de plasmina, as enzimas intracelulares apresentaram maior atividade proteolítica seguido das enzimas extracelular e periplasmáticas (KOLHMANN et al., 1991).

O leite utilizado como controle positivo teve a atividade proteolítica monitorada até o tempo 7 d. em gel de eletroforese. Os resultados da degradação das frações de caseínas ao longo do tempo podem ser visualizados na Figura 19.

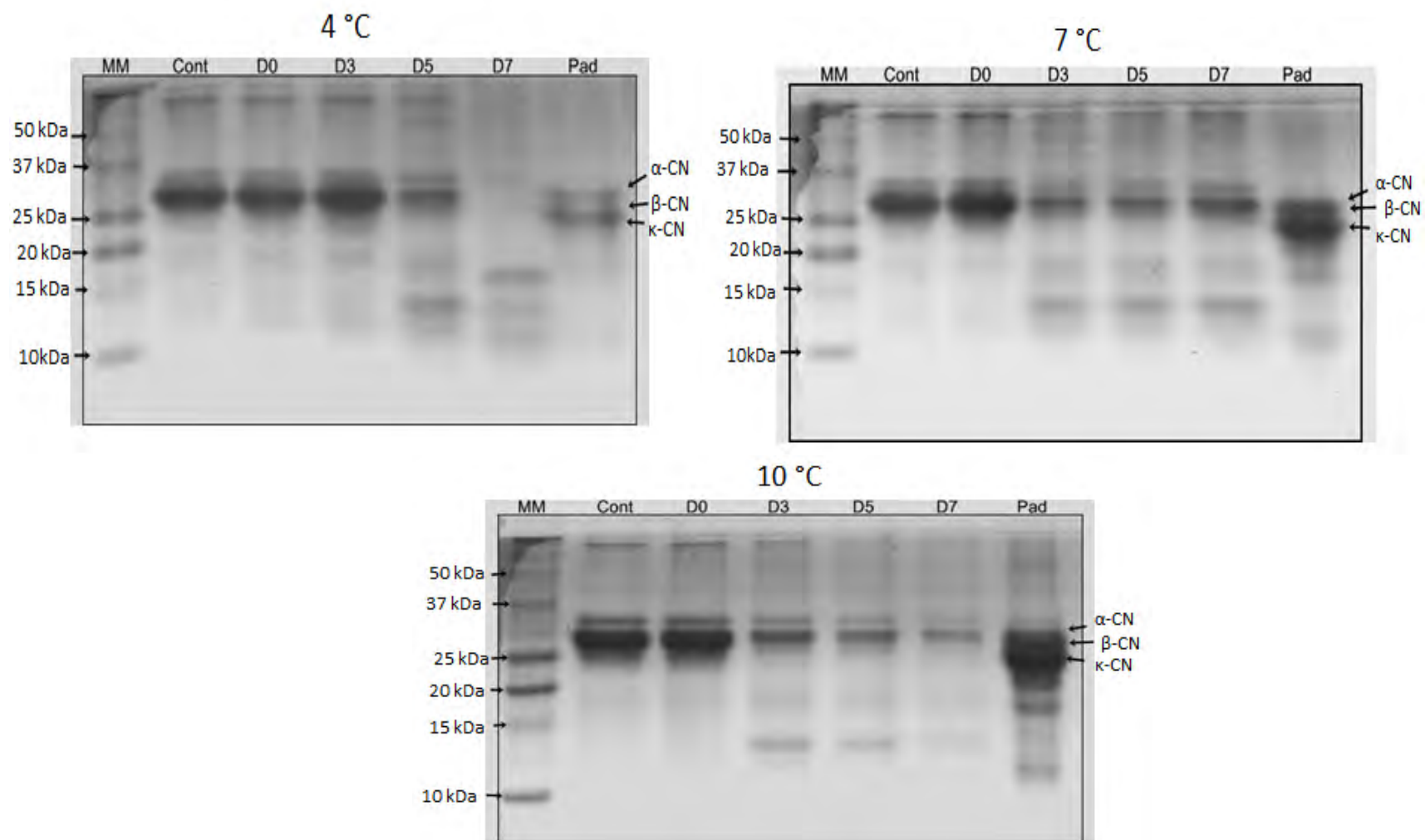


Figura 19 – Leite desnatado pasteurizado pré-incubado 48 h a 4, 7 e 10 °C com *P. fluorescens* 041 e estocado a 7 °C durante sete dias (D0 dia zero após 48 h de pré-incubação)

A intensidade de degradação das frações de caseínas aumentou com incremento do tempo de estocagem. No gel do leite pré-incubado a 4 °C, embora se perceba a liberação de alguns peptídeos de tamanho próximos a 15 e 20 kDa.(utilizando o marcador molecular como referência) no tempo 3 d, as frações de caseínas são nitidamente degradadas a partir do quinto dia com formação de peptídeos com peso entra 10 e 20 kDa, sendo as frações de caseínas completamente degradadas no sétimo dia. Para o leite pré-incubado a 7 °C a degradação fica perceptível já no terceiro dia de estocagem com formação de peptídeos entre 10 e 20 kDa até o sétimo dia. A diminuição gradativa das frações de caseínas do leite pré-incubado a 10 °C foi observada até o sétimo dia, no entanto a formação de peptídeos é maior no terceiro dia e diminui até o sétimo. Provavelmente os peptídeos formados foram degradados pelas próprias enzimas proteolítica da bactéria

Nos três géis da Figura 19 pode-se perceber a degradação preferencial das duas bandas de caseínas inferiores, representadas pelas frações β e κ -caseínas, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2002), que purificaram e avaliaram atividade proteolítica dos extratos de proteases de *P. fluorescens* obtidos do citoplasma, periplasma e no meio extracelular.

O monitoramento visual das amostras de leite controle até o sétimo dia pode ser observado na Figura 20. As modificações ocorridas no leite com aumento do tempo de estocagem auxiliam no entendimento da degradação das frações de caseínas mostrados na Figura 19.

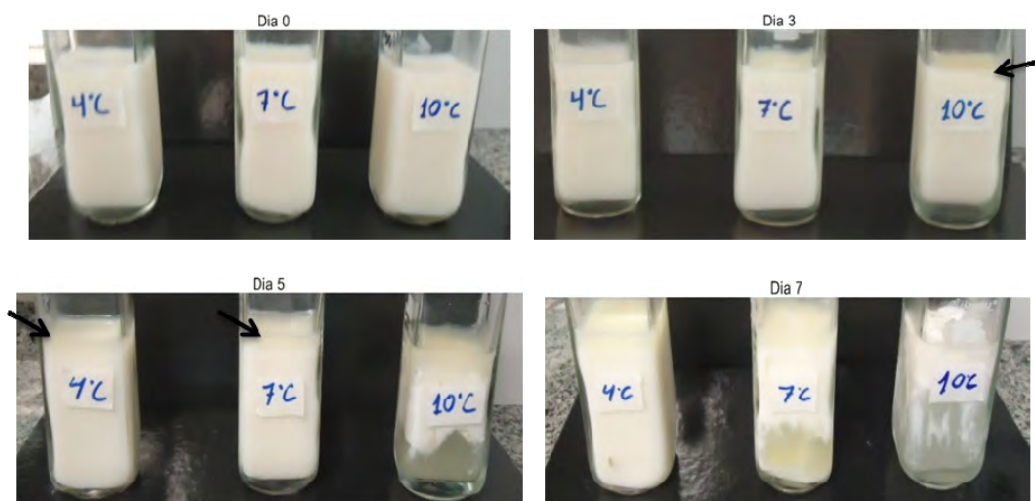


Figura 20 – Aspecto visual do leite desnatado pasteurizado pré-incubado com *P. fluorescens* 041 a 4, 7 e 10 °C por 48 h monitorado durante 7 d (Dia 0, dia após 48 h de pré-incubação)

As amostras de leite não apresentaram alterações visuais após a pré-incubação (Figura 23), enquanto no terceiro dia o leite pré-incubado a 10 °C apresentou separação de fases na borda superior, que no leite pré-incubado a 4 e 7 °C só pode ser observada no quinto dia. No sétimo dia todas as amostras estavam muito degradadas com completa separação de fase, embora a amostra de leite pré-incubado a 4 °C apresentasse maior quantidade de agregados de proteínas ainda intactas. A separação de fase demonstra clara perda de estabilidade das micelas de caseínas com formação de agregados e essa percepção só foi possível pela alta população bacteriana atingida no leite.

6.6 Análises físico-químicas antes da microfiltração

O resultado das análises físico-químicas nas amostras de leites antes da inoculação com *P. fluorescens* 041 e microfiltração podem ser visualizados na Tabela 8. O leite cru apresentou-se adequado quanto a acidez, pH, crioscopia, gordura e proteína, parâmetros físico-químicos estipulados pela Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2011). As etapas seguintes do beneficiamento do leite, o desnate e pasteurização precederam a inoculação da estirpe psicrotófica.

O LD e LDP, embora esteja nesse trabalho sendo referidos como desnatado estão na classificação de semi-desnatado por apresentarem valor de gordura entre 0,5 e 2,9 (BRASIL, 2011). Esses valores pouco acima do valor de gordura é resultado de uma descalibração da centrífuga desnatadeira.

Os valores de crioscopia do LD e LDP também ficaram acima do determinado pela legislação (BRASIL, 2011), apresentando valores superiores a -0,530 °H, indicando que houve uma pouca diluição do leite. O valor de crioscopia fora da especificação ocorreu durante a etapa de centrifugação. Foi desnatado um volume de leite relativamente pequeno para a capacidade do equipamento da planta do Laticínios Escola. O equipamento é inicialmente colocado em funcionamento com no tanque de equilíbrio alimentando a centrífuga com água industrial e quando o volume de água no tanque de equilíbrio fica baixo o leite é adicionado, quando o leite estava prestes a acabar no tanque de equilíbrio, água foi adicionada com objetivo de empurrar o leite ainda presente na linha. Nesse procedimento o leite entra em contato com água antes e ao final da centrifugação havendo uma leve

adição de água ao leite que determinou a alteração do valor de crioscopia. Por isso todos os leites após a etapa de centrifugação estão com valor de crioscopia fora da especificação.

Tabela 8 - Avaliação físico-química dos leites antes da inoculação da estirpe *P. fluorescens* 041

Análise	LC		LD		LDP	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
Acidez (g ácido láctico 100 mL ⁻¹)	0,146	0,005	0,146	0,005	0,146	0,010
pH	6,73	0,04	6,72	0,04	6,66	0,05
Crioscopia (°H)	-0,536	0,002	-0,525	0,010	-0,524	0,004
Gordura (%)	3,27	0,06	0,53	0,12	0,60	0,02
Proteína (%)	3,32	0,07	3,19	0,08	3,22	0,12
NPN (%)	0,20	0,07	0,16	0,01	0,21	0,06
NCN (%)	0,80	0,14	0,85	0,22	0,66	0,24

LC = Leite Cru; LD = Leite Desnatado; LDP = Leite Desnatado Pasteurizado

As amostras de leite desnatado e pasteurizado incubadas com a estirpe de *P. fluorescens* 041 mantidos refrigerados a 4, 7 e 10 °C por 48 h apresentaram os valores das análises físico-químicas mostrados na Tabela 9. Os resultados estão coerentes com os das amostras utilizados antes da inoculação da bactéria. As frações nitrogenadas foram também analisadas para verificar se o tempo de pré-incubação do leite com a bactéria psicrotrófica durante as 48 h haveria uma proteólise detectável pela técnica. O leite pré-incubado a 10 °C apresentou um maior valor da fração NCN comparado aos pré-incubados a 4 e 7 °C, embora também tenha havido maior desvio padrão.

Tabela 9 - Avaliação físico-química do LDP após o período de pré-incubação por 48 h com *P. fluorescens* 041

Análise	LDP+PF 4 °C		LDP+PF 7 °C		LDP+PF 10 °C	
	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad	Média	Desv Pad
Acidez (g ácido láctico 100 mL ⁻¹)	0,142	0,009	0,146	0,005	0,146	0,005
pH	6,66	0,07	6,63	0,02	6,66	0,06
Crioscopia (°H)	-0,523	0,006	-0,519	0,007	-0,525	0,006
Gordura (%)	0,38	0,14	0,50	0,00	0,60	0,00
Proteína (%)	3,14	0,23	3,15	0,18	3,26	0,09
NPN (%)	0,21	0,06	0,19	0,04	0,22	0,09
NCN (%)	0,78	0,11	0,77	0,08	0,87	0,30

LDP + PF = Leite Desnatado Pasteurizado incubado com *P. fluorescens* 041

Os valores de pH e das frações nitrogenadas até o tempo de pré-incubação do leite utilizado como controle positivo podem ser observados na Tabela 10. Não houve alteração nos valores de pH, NPN nas amostras de leite antes da inoculação da bactéria psicrotrofica até o fim da pré-incubação e o teor de proteína foi analisado somente no leite pasteurizado. Somente o valor de NCN da amostra pré-incubada a 10 °C apresentou um ligeiro aumento dando indícios do início da proteólise, resultado também encontrado para o leite antes da microfiltração que foi pré-incubado a 10 °C.

Tabela 10 - Análises físico-químicas do LDP controle positivo até às 48 horas de pré-incubação

Amostra	LDP	LDP +PF41 ^a	LDP+PF 4 °C ^b	LDP+PF 7 °C ^b	LDP+PF 10 °C ^b
Proteína (%)	3,07	3,07	3,07	3,07	3,07
NPN (%)	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22
NCN (%)	0,68	0,68	0,68	0,68	0,76
pH	6,68	6,68	6,70	6,66	6,66

^a LDP (Leite Desnatado Pasteurizado) após inoculação *Pseudomonas* 041

^b LDP (Leite Desnatado Pasteurizado) com *Pseudomonas* 041 após 48 horas pré-incubação

6.7 Análises físico-químicas do leite desnatado pasteurizado microfiltrado

6.7.1 Nitrogênio não proteico (NPN) e nitrogênio não caseínico (NCN)

A atividade proteolítica sobre a caseína foi avaliada por meio do monitoramento das frações nitrogenadas do leite. O NPN e o NCN foram quantificados durante os 30 d de análises. O aumento dessas frações é indício de atividade proteolítica sobre as frações de caseína (DATTA et al. 2003 ; TOPÇU et al. 2006).

Peptídeos oriundos da hidrólise do leite pela plasmina, proteases e peptonas são moléculas relativamente grandes que são precipitadas em TCA (12%, 4%), mas permanece solúvel durante a precipitação isoelétrica em pH 4,6 (ANDREWS e ALICHANIDIS, 1983). Em contraste, os produtos da proteólise do leite por ação de proteases bacterianas são peptídeos menores e aminoácidos os quais são solúveis em TCA e pH 4,6. Conseqüentemente, peptídeos em filtrados de TCA são originários de proteases microbianas, enquanto peptídeos em filtrado pH 4,6 podem ser de origem tanto de proteases microbianas quanto da plasmina (LOPEZ-FANDINO et al. 1993; DATTA et al., 1999; DATTA e DEETH 2003). No entanto, em temperaturas de refrigeração a plasmina não demonstrou ser significativa na

proteólise como as proteases de uma estirpe de *P. fluorescens* (GUINOT-THOMAS et al., 1994).

No leite o NPN representa aproximadamente 3 % da fração nitrogenada e os principais componentes são ureia, ácido úrico, creatina e aminoácidos (FOX, 2009). A exposição prolongada do leite a bactérias proteolíticas faz com que a fração de NPN aumente em virtude da degradação das caseínas em peptídeos, e os últimos em aminoácidos e compostos aminados.

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) dos coeficientes da equação ajustada na concentração de NPN entre as temperaturas de pré-incubação do leite, somente para o tempo de armazenamento refrigerado. Embora um comportamento quadrático seja observado principalmente no intervalo de tempo entre 10 e 30 d, o valor do coeficiente é muito baixo. A equação ajustada (Eq. 5) a partir do modelo de segundo grau completo pode ser observada abaixo.

$$\text{NPN} = 0.19 - 0,0026 \times \text{TP} + 0,000089 \times \text{TP}^2 \text{ (Eq. 5)}$$

sendo TP = variável tempo de estocagem a 7 °C;

TP2 = efeito quadrático do tempo de estocagem a 7 °C.

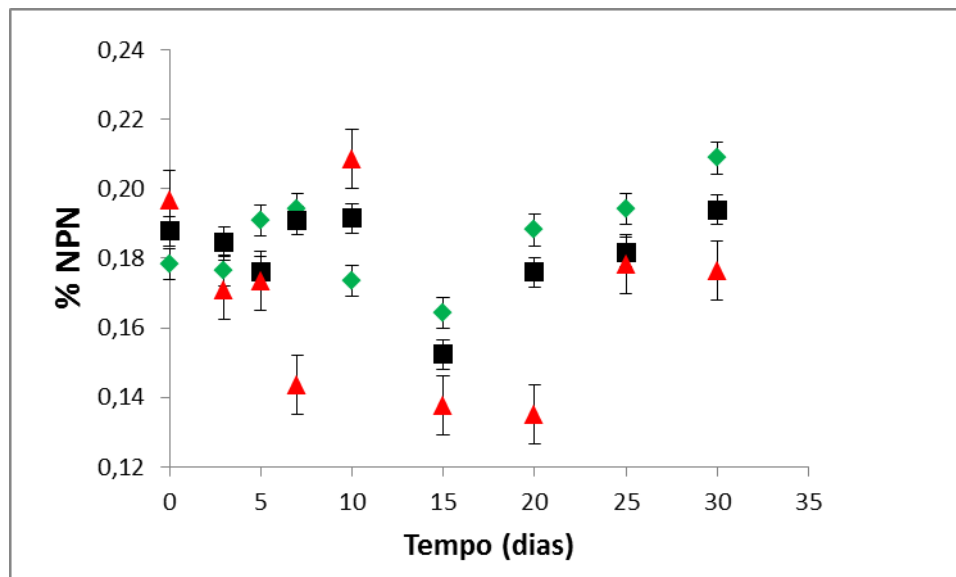


Figura 21 – Média de NPN de três repetições das amostras de leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubadas a 4 °C (—●—), 7 °C (—■—) e 10 °C (—▲—), monitoradas durante 30 d

Embora tenha ocorrido efeito significativo do tempo de estocagem a relação não é de linearidade como se a proteólise estivesse sido caracterizada. Pelo gráfico de dispersão (Figura 21) observasse-se uma tendência a valores constantes ao

longo do tempo. Logo, o efeito da possível proteólise em função da presença de enzimas secretadas pela bactéria psicrotrófica utilizada no experimento não foi caracterizado.

O NCN representa, aproximadamente, 22% da fração de nitrogênio do leite e é constituída pelos componentes nitrogenados solúveis que engloba as proteínas do soro e também a fração NPN (FOX, 2009). A proteólise primária da caseína contribui para o aumento de NCN em virtude da transferência de peptídeos hidrolisados da micela de caseína para fração solúvel (DATTA e DEETH, 2003). A fração nitrogenada NCN foi monitorada durante trinta dias como pode ser observado na Figura 22. Houve efeito do coeficiente linear da temperatura de pré-incubação ($P < 0,05$) e nenhuma influência do tempo de estocagem refrigerado. A equação ajustada (Eq. 6) com os coeficientes significativos a partir do modelo de segundo grau completo foi:

$$\text{NCN} = 0,727 + 0,0086 \times \text{TR} \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo TR = variável temperatura de pré-incubação;

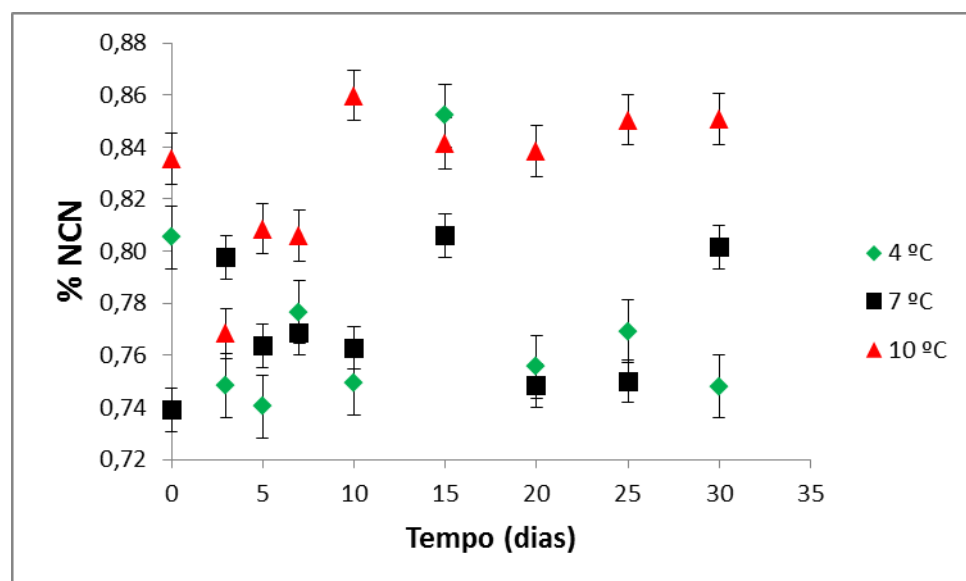


Figura 22 – Média de NCN de três repetições das amostras de leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubadas a 4 °C (—●—), 7 °C (—■—) e 10 °C (—▲—), monitoradas durante 30 d

Os resultados mostram-se constantes ao longo do tempo, mas o leite pré-incubado a 10 °C apresentou maiores valores ao longo do tempo. O leite desnatado pasteurizado pré-incubado a 10 °C apresentou maior valor de NCN antes a microfiltração, esse valor manteve-se constante e maior do que os valores de NCN

dos leites pré-incubados a 4 e 7 °C. Embora nas três temperaturas de pré-incubação as contagens de micro-organismos psicrotórficos tenha sido próximas após as 48 h, os resultados demonstram que na pré-incubação a 10 °C as enzimas tiveram atividade proteolítica provavelmente pela proximidade de sua temperatura ótima. Essa proteólise não aumentou após a microfiltração sugerindo que as enzimas proteolíticas tenham sido removidas com célula bacteriana durante a microfiltração.

As concentrações de *P. fluorescens* atingidas após as 48 h de pré-incubação nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C podem não ter sido suficiente para secreção de quantidades viáveis de proteases que pudessem degradar as caseínas.

No leite controle positivo a proteólise foi monitorada por meio das frações nitrogenadas até o sétimo dia. A evolução da proteólise pela fração NPN pode ser observada na Figura 23. A proteólise do leite pré-incubado a 4 °C foi retardada na proteólise até o terceiro dia com ligeiro aumento em relação a tempo zero, já as amostras de leite pré-incubados a 7 e 10 °C apresentaram proteólise intensa no terceiro dia de estocagem. No quinto dia todas as amostras de leite apresentaram proteólise intensa e aumentou até o sétimo dia.

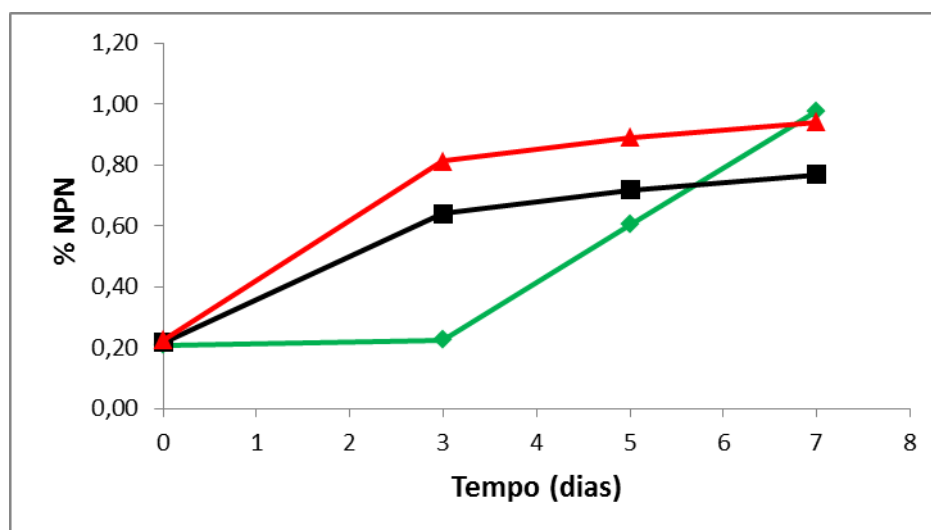


Figura 23 – Monitoramento do NPN da amostra leite desnatado pasteurizado durante 7 d após pré-incubação com *P. fluorescens* 041 a 4 °C (—◆—), 7 °C (—■—) e 10 °C (—▲—) por 48 h

O monitoramento da proteólise do leite controle, pela fração NCN pode ser observado na Figura 24. Assim como no NPN, o leite pré-incubado a 4 °C apresentou aumento da proteólise no tempo 3 d, aumentando bruscamente no quinto dia. Já os leites pré-incubados a 7 e 10 °C tiveram proteólise intensa no terceiro dia com ligeiro aumento até o sétimo dia.

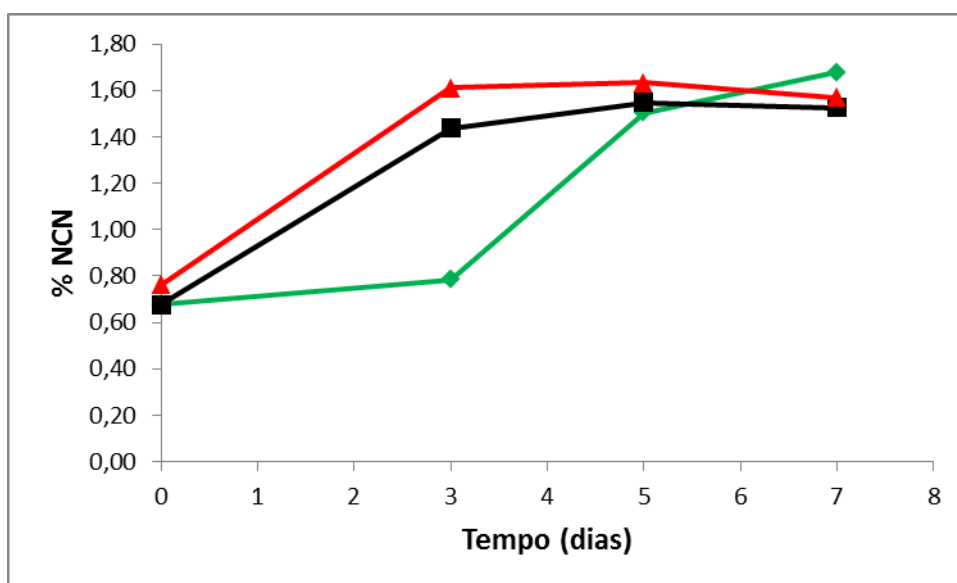


Figura 24 – Monitoramento do NCN da amostra de leite desnatado pasteurizado durante 7 d após pré-incubação com *P. fluorescens* 041 a 4 °C (—◆—), 7 °C (—▲—) e 10 °C (—■—) por 48 h

6.7.2 Acidez

A legislação estabelece que o leite tenha acidez titulável na faixa de 0,14 a 0,18 gramas de ácido lático por 100 mL de leite (BRASIL, 2011). Apesar de a acidez ser expressa em ácido lático, essa acidez chamada de acidez natural é determinada pelos constituintes ionizáveis como fosfato, citrato, carbonato e proteínas (CROGUENNEC et al., 2008). Um aumento no valor de acidez fora da faixa de acidez natural é acidez desenvolvida, que ocorre devido à presença de bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de, principalmente, ácido lático, sendo as bactérias lácticas as principais responsáveis pelo aumento de acidez no leite.

Os valores de acidez durante os 45 d monitorados estiveram sempre dentro da faixa de acidez natural (Figura 25), resultado esperado uma vez que o leite microfiltrado não deveria desenvolver acidez. Apesar de ter ocorrido alguns pontos de contaminação ao longo do tempo nos leites pré-incubados nas três temperaturas, o nível de contaminação não foi o suficiente para alterar a acidez fora da faixa normal do leite.

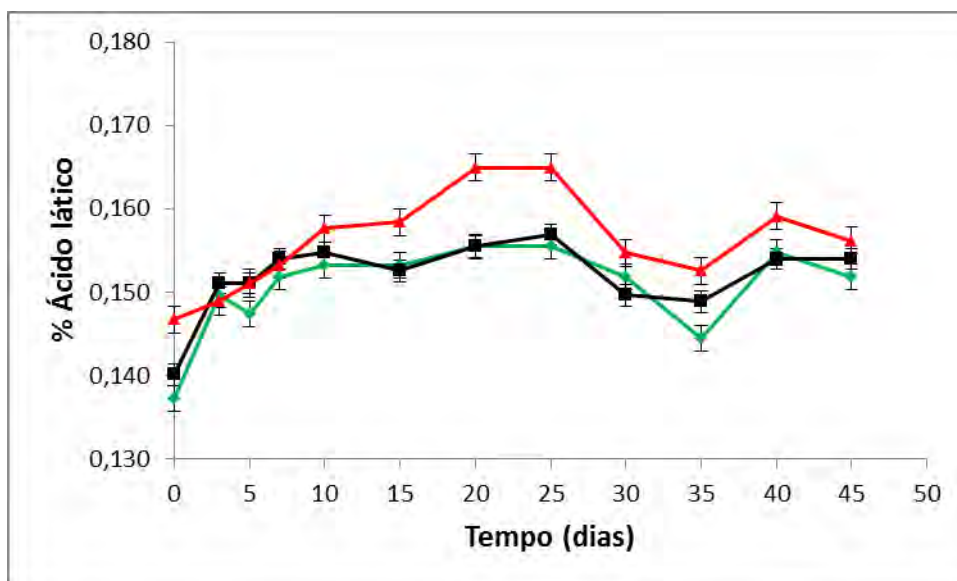


Figura 25 – Acidez média obtida de três repetições das amostras de leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubadas a 4 °C (●), 7 °C (▲) e 10 °C (■), monitoradas durante 45 d

6.7.3 pH

O pH do leite a 20 °C varia entre 6,6 e 6,8. Logo após a ordenha ele tende a estar mais próximo de 6,6 e tem um ligeiro aumento depois de algumas h em virtude da presença de CO₂ dissolvido na fase aquosa do leite que é liberado (CROGUENNEC et al., 2008). O resultado dos valores de pH ao longo dos 45 d podem ser visualizados na Figura 26.

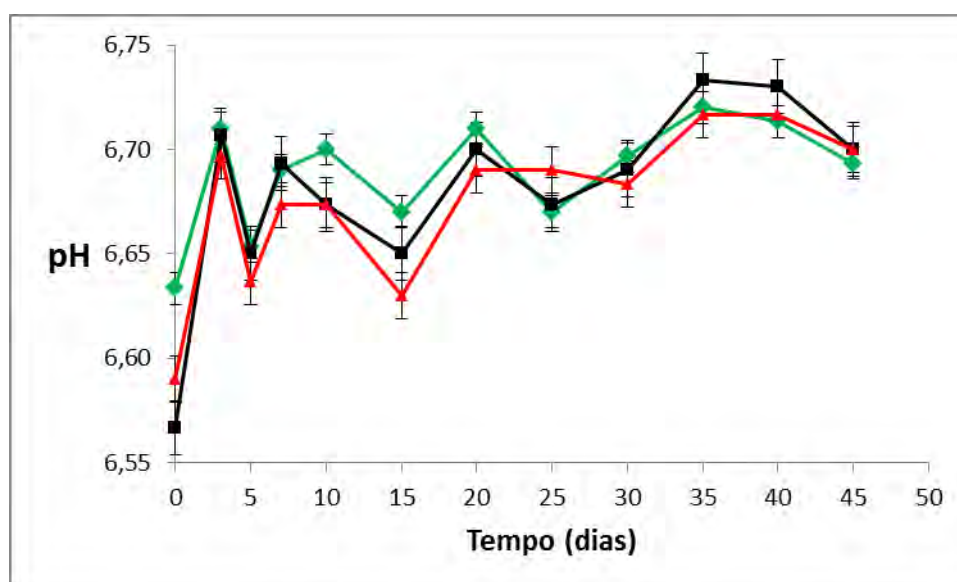


Figura 26 – pH médio obtida de três repetições das amostras de leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubadas a 4 °C (●), 7 °C (▲) e 10 °C (■), monitoradas durante 45 d

Houve uma relação linear entre o pH e tempo, percebeu-se um ligeiro aumento no valor de pH com aumento do tempo de estocagem, mas sempre dentro da faixa de pH do leite. Com esses resultados indicam que se o leite permanecer estocado numa faixa de temperatura entre 4 a 10 °C e se os níveis de contaminação por *P. fluorescens* mantivessem abaixo de $5,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ antes da microfiltração, o leite microfiltrado não alteraria o valor de pH fora da faixa normal do leite durante o tempo estocagem estudado.

No leite utilizado como controle positivo o valor de pH permaneceu constante até o tempo 3 d para os leite pré-incubados a 7 e 10 °C, enquanto na pré-incubação a 4 °C o leite manteve-se com pH constante até o quinto dia (Figura 27). Os valores de pH abaixaram bruscamente devido provavelmente a perda de capacidade tamponante do leite afetada pela intensa proteólise.

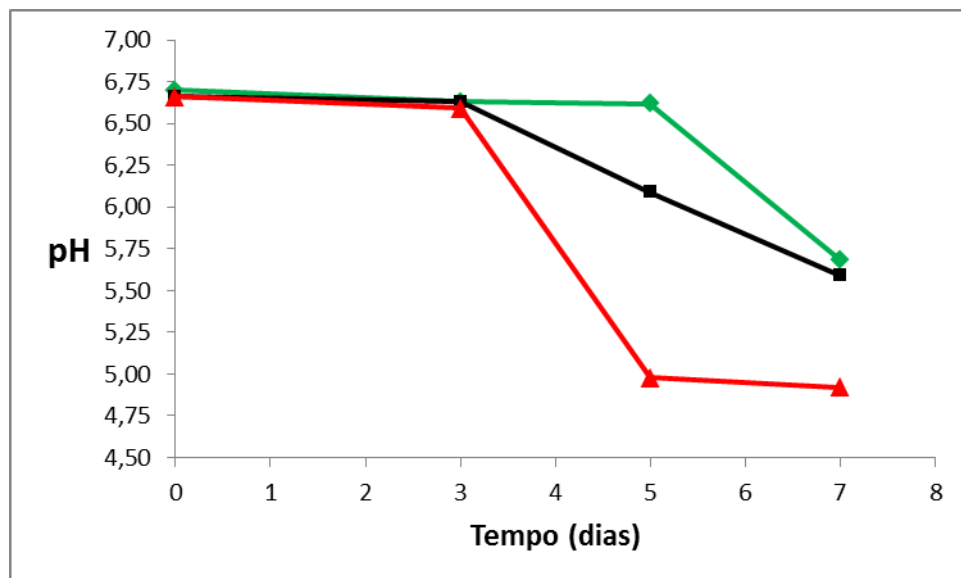


Figura 27 – Monitoramento do pH após 48 h de pré-incubação a 4 °C (—◆—), 7 °C (—▲—) e 10 °C (—■—)

6.7.4 Crioscopia

A pressão osmótica, ponto de congelamento e ponto de ebulição do leite é dependente do número de moléculas dissolvidas na fase aquosa do leite (CROGUENNEC et al., 2008). Essas propriedades são correlacionadas umas as outras. A pressão osmótica do leite é constante por que está em equilíbrio com a pressão osmótica do sangue durante a síntese do leite e o ponto de congelamento é relativamente estável permanecendo numa faixa aproximadamente constante para o leite de conjunto (CROGUENNEC et al., 2008).

A distribuição dos valores de crioscopia ao longo dos 45 d pode ser observada na Figura 28. Ao longo do tempo os valores permaneceram estáveis. Maiores valores no ponto de congelamento foram observados para o leite pré-incubado a 7 °C. Essa diferença foi causada pelos valores referentes provavelmente a terceira repetição, que foram bem superiores às demais. Durante a etapa de microfiltração o processo teve que ser interrompido para limpeza e ao reiniciar o processo o leite foi um pouco diluído levando a valores de crioscopia maiores. Isso fez com que a média geral de crioscopia para temperatura de pré-incubação a 7 °C aumentasse.

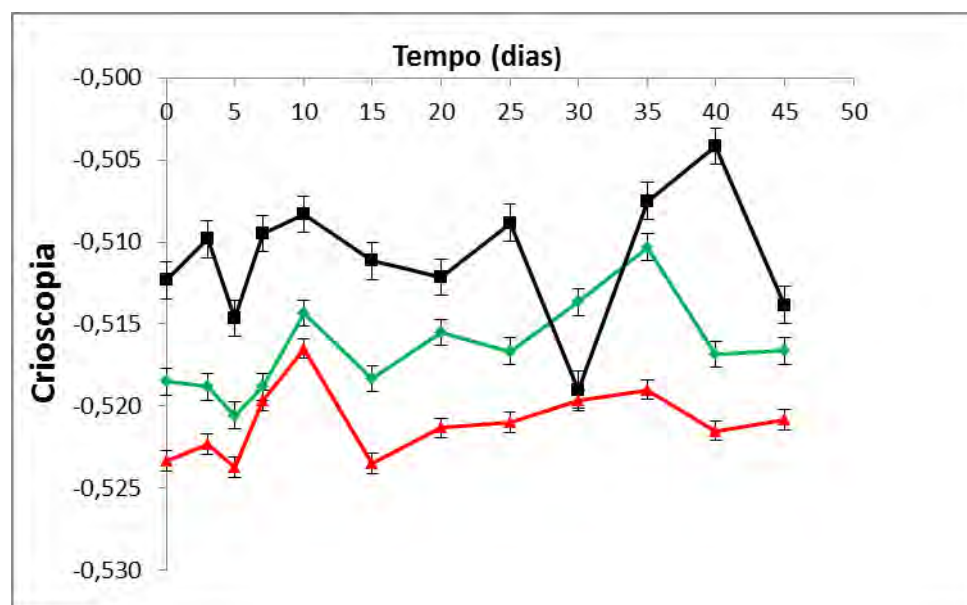


Figura 28 – Crioscopia média obtida de três repetições das amostras leite desnatado pasteurizado microfiltrado pré-incubadas a 4 °C (—▲—), 7 °C (—▲—) e 10 °C (—▲—), monitoradas durante 45 d

7. CONCLUSÃO

Os isolados de bactérias psicotróficas proteolíticas 04A, *P. fluorescens* 07A e 11A apresentaram forte atividade proteolítica no leite desnatado reconstituído com intensidade aumentando com incremento na temperatura de estocagem. O isolado 06D apresentou pouco atividade proteolítica.

O leite desnatado microfiltrado previamente inoculado com a estirpe psicotrófica proteolítica de *P. fluorescens* 041 não teve suas características físico-químicas alteradas durante o armazenamento por 45 d. Não foi detectada atividade proteolítica no leite microfiltrado durante os trinta dias de monitoramento utilizando a técnica de eletroforese, sugerindo que a após o tempo de pré-incubação nas três temperaturas de refrigeração a estirpe de *P. fluorescens* 041 não secretou enzimas proteolíticas em concentração suficiente para hidrolisar a caseína do leite microfiltrado. As frações nitrogenadas NPN e NCN permaneceram constantes durante os trinta dias de monitoramento do leite microfiltrado. No entanto, para o leite pré-incubado a 10 °C os valores de NCN após as 48 h de pré-incubação foram superiores aos das amostras pré-incubadas a 4 e 7 °C e, permaneceu superior durante a avaliação do leite microfiltrado. Esse resultado demonstra que houve uma proteólise durante a pré-incubação, mas foi cessada após microfiltração. Essa proteólise foi atribuída a enzimas proteolíticas que estariam ligadas a *P. fluorescens* 041 e, que teriam sido removidas junto com a bactéria pelo processo de microfiltração, por serem enzimas de membrana.

Pela observação do gel de eletroforese do leite desnatado inoculado com *P. fluorescens* 041 utilizado como controle positivo confirmou a proteólise preferencial das frações κ e β -caseína.

8. SUGESTÕES

Para pesquisas futuras algumas sugestões podem ajudar na execução do trabalho. Para monitoramento da proteólise em leite desnatado seria interessante que as proteases produzidas pela bactéria fossem quantificadas antes e posteriormente a microfiltração.

O estudo com leite microfiltrado inoculado com cultura psicotrófica provavelmente teria resultados interessantes se o leite fosse estocado a temperatura ambiente, mas para isso seria um envase asséptico durante a microfiltração.

Como as quatro frações de caseínas têm massa molecular próximas a técnica de eletroforese SDS-PAGE poderia ser substituída pela técnica de eletroforese UREASE-PAGE para conseguir separação mais nítida.

Métodos cromatográficos associados a equipamentos de detecção são mais recomendados e sensíveis para quantificar a proteólise do leite.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 828-35, 1975.
- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 823-37, 1976.
- ANDREWS, A. T.; ALICHANIDIS, E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovinemilk, **Journal Dairy Research**. v. 50, p. 275–290, 1983.
- AFSSA. Avis relatif à l'évaluation de l'efficacité et de l'intérêt nutritionnel et microbiologique d'un procédé de traitement de conservation du lait de consommation utilisant la technique de microfiltration, 2002.
- ANDRADE, N. J.; SALUSTIANO, V. C. Qualidade Microbiologica do Ar de Ambientes de Processamento de Alimentos. In : ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. 1 ed. São Paulo : Varela, 2008. cap. 7, 412 p.
- ANNAN, W. D.; MANSON, W. Fractionation of the α_s -casein complex of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 36, p. 259-268, 1969.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Counts, isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from refrigerated raw milk. **Ciência Rural**, v.38, p. 2250–2255, 2008.
- BAKER, R. W. Overview of membrane science and technology. In: **Membrane technology and applications**. NY, USA: Wiley, New York, p. 1–18, 2004.
- BHAKOO, M.; HERBERT, R. A. The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligately psychrotrophic *Vibrio* spp. **Arch Microbiol**. v. 121, p. 121-127, 1979.
- BHAKOO, M.; HERBERT, R. A. Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at diferente temperatures. **Arch Microbiol**. v. 126, p. 51-55, 1980.
- BOTTON, P. D.; ROGINSKI, H.; DEETH, H. C.; CRAVEN, H. M. Improved Shelf Life Estimation of UHT Milk by Prediction of Proteolysis. **Journal of Food Quality**. v. 34, p.229-235, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.251 , p. 7-11, 30 dez. 2011. Seção I.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Escola de Engenharia. Porto Alegre, RS. 2008. 163p.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: un update. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 435-37, 1996.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrofica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa- MG, 2006.

CARVALHO, A. F, MAUBOIS, J. L. Applications of membrane technologies in the dairy industry. In: COIMBRA, J. S. R., TEIXEIRA, J. A. (Eds.) **Engineering aspects of milk and dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2010, 256p

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted uht-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of uht milk on its physico-chemical attributes and flavor. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 129-140, 1997.

CHAN, M.; HIMES, R. H.; AKAGI, J.M. Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic and psychrophilic clostridia. **Journal of Bacteriology**. v. 106, p. 876-881, 1971.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.

CHEN, T. R.; WEI, Q. K.; CHEN, Y. J. *Pseudomonas* spp. *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. **Food control**, v. 22, p. 697-701, 2011.

CORREIA, L. F.; SILVA, E. C.; CARVALHO, A. F. Curso de treinamento em técnicas de membranas. Material didático. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

COSTA, L.M.; GÓMEZ, M.F.; MOLINA, L.H.; ROMERO, A. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 52, p. 1-13, 2002.

- COUSIN, M. A.; MARTH, E. H. Lactic acid production by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 406-410, 1977.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 172-207, 1982.
- CROGUENNEC, T.; JEANTET, R.; BRULÉ, GÉRARD, B. Composition et caractéristiques physicochimiques des laits In: **Fondements physicochimiques de la technologie laitière**. Paris: Lavoisier, 2008. 161 p. p. 1-9.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Age gelation of UHT milk: a review. **Transactions of the Institute of Chemical Engineers**, v.79, p. 197-210, 2001.
- DATTA, N.; DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 36, p. 173–182, 2003.
- DIAS, G. **Microfiltração como alternativa na produção de queijos com olhaduras e utilização da fase aquosa para avaliação de suas características físico-químicas**. 2011. 101 p. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa .Viçosa-MG, 2011.
- DRIESSEN, F. M. STADHOUDERS, J. Enzymic spoilage in pasteurized and sterilized milk products. I. Proteolysis, **Voedingsmiddelen technol**, v. 12, p.35–37, 1979.
- DUFOUR, D.; NICODEME, M.; PERRIN, C.; DRIOU, A.; BRUSSEAU, E.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L.; DARY, A. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* ssp. Isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by some of them. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.188– 196, 2008.
- ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 9, p. 829-834, 1998.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. 3rd edn. Proteins, vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003.
- GLORIA, M. B. A.; SARAIVA, P. R. L.; RIGUEIRA, J. C. S.; BRANDÃO, S. C. C. Bioactive amines changes in raw and sterilised Milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n^o 1, p.45-51, 2011.
- GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M. A.; ROUX, Y.; LAURENT, F. Study of Proteolysis during Storage of Raw Milk at 4 °C: Effect of Plasmin and Microbial Proteinases. **International Dairy Journal**. v. 5, p. 685-697, 1995.

- GOMES, F. S. **Concentração de licopeno de suco de melancia através de processos de separação por membranas.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Tecnologia. Seropédica, RJ, 2009. 95p.
- HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A.J.; DEETH, H.C. Production of protease by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, p.15-20, 2003.
- FAUQUANT J.; MAUBOIS J.-L.; PIERRE A. Microfiltration du lait sur membrane minérale, **Tech. Lait**. v. 1028 p. 21–23, 1988.
- FOX, P. F. Milk: an overview. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. **Milk proteins: from expression to food.** Elsevier Inc. p. 1-54, 2009.
- FURTADO, M. M. **Queijos com olhaduras.** Fonte Comunicações e Editora Ltda. São Paulo – Brasil. 2007. p.135.
- GAUCHERON, F. **Minéraux et Produits Laitiers.** Tec et Doc, Paris, France, 2004.
- GILLOT, J.; GARCERA, D. Ceraver: nouveaux médias filtrants céramiques, **Tech. Lait**. 1007, v. 23, 1986.
- HERBERT, R. Psychrophilic organisms. In: **Microbes in Extreme Environments.** Hebert, R. ; GODD, G. (eds). Academic Press, London,p. 1-23, 1986.
- HUMBERT, G.; BRUN-BELLUT, J.; MORA, T. ; ALAIS, C. Proteinase activity in bovine raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2271-77, 1983.
- ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). **Microrganismos de los alimentos.** 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia. 804p., 1994.
- IDF (International Dairy Federation) **101A: 1991:** Enumeration of psychrotrophic micro-organisms. 3p. 1991.
- IDF (International Dairy Federation) **20B:1993:** milk: determination of nitrogen content, 11f., 1993.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology.** 7^o ed. Springer Science and Business Media, Inc., New York, p. 395-409, 2005.
- JONES, P. G.; VAN BOGELLEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Inductions of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2092-2095, 1987.

- JUDD, R. C. Electrophoresis of peptides. In: Walker JM (ed.), **Methods in molecular Biology**, vol. 32, Basic Protein and Peptide Protocols. Totowa, Humana Press Inc., p. 49-57, 1994.
- KOHLMANN, K. L.; NIELSEN S. S.; STEENSON L. R.; LADISCH, M. R. Production of Proteases by Psychrotrophic Microorganisms. **Journal Dairy Science**. v. 74, p. 3275-3283, 1991.
- KOHLMANN, K. R. **Native and Microbial Proteases in Milk and Their Role in the Gelation of UHT Milk**. Thesis (Purdue University), pp 141, 1979.
- KRAJEWSKA, E.; SZER, W. Comparative studies of amino acid incorporation in a cell-free system from psychrophilic *Pseudomonas* sp. **European Journal of Biochemistry**. v. 2, p. 250-256, 1967.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.
- LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v.44, p.145–148, 1977.
- LINDQUIST, A. **A method for the production of sterile skimmed milk**, PCT Pat. WO No. 57549, 1998.
- LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. Sea water demineralization by means of na osmotic membrane. In: **Saline water conversion—II, Advances in Chemistry** Series n°. 28. Washington, DC, USA: American Chemical Society. p. 117–132, 1963.
- LOPEZ-FANDINO, R.; OLANO, A.; SAN JOSE, C.; RAMOS, M. Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. **Journal Dairy Research**. v. 60, p. 111–116, 1993.
- MADEC, M.N.; MÉJEAN, S.; MAUBOIS J.-L. Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration (Bactocach process), **Lait**, v. 72, p. 327–332, 1992.
- MALMBERG, M.; HOLM, S. Low bacteria skim milk by microfiltration, **North Eur. Food Dairy Journal**. v. 54, p. 75–78, 1998.
- MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; HEYNDRIKX, M.; DEWETTINCK, K.; BLOCK, J. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 514-519, 2008.
- MARCHAND, S.; VANDRIESCHE, G.; COOREVITS; COUDIJZER, K.; JONGHE, V.; DEWETTINCK, K.; VOS P.; DEVREESE, B.; HEYNDRIKX, M.; BLOCK, J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**. v. 133, p. 68-77, 2009.

- MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; ROCHA, B.; ARAÚJO, E. F.; VANETTI M. C. D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 144-148, 2006a.
- MARTINS, J. L. F.; AZEREDO, R. M. C.; MILAGRES, R. C. R. M.; COELHO, A.I.M.; SANTANA, A. M. C. Avaliação da contaminação do ar em serviços de alimentação. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, jul. 2006b.
- MATTA, H.; PUNJ. V.; KANWAR, S. S. An immuno-dot blot for detection of thermoestable proteases from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. **Letters in Applied Microbiology**. v. 25, p. 300-302, 1997.
- MCKELLAR, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. CRC Press. Boca Raton, Fl, 310 p. 1989.
- MCMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Supramolecular structure of the casein micelle. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 1709-21, 2007.
- MELLANDER, O. Electrophoretic studies of casein. **Biochemische Zeitschrift**, v.300, p. 240-245, 1939.
- MERCK. The Merck-BIOQUANT[®] Proteinase assay. Australia, 1999.
- MORITA, R.Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriol. Rev.** 39:144–167, 1975.
- MU, Z.,; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. **European Food Research and Technology**, v.228, p.725–734, 2009.
- MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Boston, MA, USA: Kluwer Academic Publishers, 1996.
- MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.20, n.8, p.606 611, 2000.
- NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6628-6634, 2002.
- NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.41–46, 2009.
- OLIVEIRA L. C.; GOMES, M. F.; VELLOSO, C. R. V. Modernização da Legislação Sanitária Federal sobre Leite e Derivados. In: CASTRO, M. C. D.; PORTUGAL,

- J. A. B. **Perspectivas e Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000. 278 p.
- PIERRE, A.; LE GRAET, Y.; DAUFIN, G.; MICHEL, F.; GÉSAN, G. Whey microfiltration performance: influence of protein concentration by ultrafiltration and of physicochemical pretreatment. **Lait**, v. 74, p. 65–77, 1994.
- PIERRE, A.; GOUDÉDRANCHE, H.; GAREM, A.; DAUFIN, G. Industrie Laitière, in: Daufin D., René F., Aimar P. (Coords.), **Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire**, Tec. Doc. Lavoisier, Paris, p. 282–371, 1998.
- PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotólicas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 2004. 97p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa .Viçosa-MG, 2004.
- PINTO, M. S. **Efeito de embalagens flexíveis na qualidade de leite pasteurizado e na sua aceitabilidade**. 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2009.
- POULIOT, Y. Membrane processes in dairy technology – From a simple idea to worldwide panacea. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 735-740, 2008.
- RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by action of psychrotrophic protease on κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 625-630, 2000.
- RICHARDSON, B. C.; TE WHAITI, I. E. Partial characterization of heat stable extracellular proteinases of some psychrotrophic bacteria from raw milk. **New Zealand Society of Dairy Science and Technology**. v.13, p. 172–176, 1978.
- RUSSELL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. **Philos. Trans. Roy. Soc.** London, 326, p. 595-611, 1990.
- RUSSELL, N. J.; FUKUNAGA, N. A comparison of thermal adaptation of membranes lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** v.75, p. 171-182, 1990.
- RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v.8, p.7-9, 1999.
- SABOYA, L. V., MAUBOIS, J. L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**. v.80, p.541–553, 2000.
- SANDBLOM, R. M. Filtering process. SW Patent no. 74.16.257, 1974.
- SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, G. N.; BARROS, J. C.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. **Boletim do CEPPA**, v. 28, n. 2, p. 314-320, 2010.

- SCHRODER, M.; COLLINS, C.; MCKINNON, C. Effect psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keep quality. **The Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 619-630, 2009.
- SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p.432-437, 1994.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Editora Varela, p.137-148, 2007.
- SILVEIRA, A. C. P.; SUDA, J. Y.; LANNA, B.; NETTO, G. G.; CARVALHO A. F. Desenvolvimento de Leite Cru Microfiltrado. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, n. 369, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, set. 2010.
- STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Thermal Denaturation of Bacterial Enzymes in Milk. In: **Heat Induced Changes in Milk**, Fox, P. I. ed. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, p. 349-363, 1995.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.35-37, 1997.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Microbial Enzymes in the Spoilage of Milk and Dairy Products. In: **Food Enzymology**, Fox, P. I., ed. Vol. 1, Elsevier, p. 169-218, 1991.
- TOPÇU, A. ; NUMANOGLU, E. ; SALDAMLI, I. Proteolysis and Storage stability of UHT Milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 633-638, 2006.
- TROUVÉ, E. ; MAUBOIS, J.-L. ; PIOT, M. ; MADEC, M.-N. ; FAUQUANT, J. ; ROUAULT, A. ; TABARD, J. ; BRINKMAN, G. Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. **Lait**, v. 71, p. 1-13, 1991.
- URAZ, G.; CITAK, S. The isolation of Pseudomonas and other gram (-) psychrotrophic bacteria in raw milk. **Journal Basic of Microbiology**, v. 38, p. 129-134, 1998.
- VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Thermozyms: Identifying Molecular Determinants of Proteins Structural and Functional Stability. **Trends Biotechnol.** v. 14, p. 183-190, 1996.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. Taylor e Francis Group, USA, 2006.

- WALKER, S. J. Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 41, p. 91-92, 1988.
- WALKER, J. M. Electrophoresis of Proteins and Peptides and Detection in Gels. In : WALKER, J. M. **The Proteins Protocols Handbook**. 2 ed. Totowa, New Jersey : Humana Press, 2002. part II, cap. 11, p. 61-69.
- WAUGH, D. F.; VON HIPPEL, P. H. κ -Casein and the stabilization of casein micelles. **Journal of American Chemical Society**, v. 78, p. 4576-4582, 1956.
- WASSIF, C.; CHEEK, D.; BELAS, R. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 5790-5798, 1995.
- WEHR H. M. W.; FRANK, J. F. **Standard Methods for The Examination of Dairy Products**. In: American Public Health Association. 17th, Washington, 2004.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINNEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 2085-2095, 2000.